ЗАНЯТИЕ **17**

ТЕМА**:** МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ

ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**.** МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

И САНИТАРНО**-**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ**,** ВОДЫ И ВОЗДУХА

Санитарная микробиология изучает микрофлору окружающей среды (воды, воздуха, почвы, продуктов питания, предметов обихода) и ее влияние на здоровье человека. Зародившись, как прикладная отрасль медицинской микробиологии, предназначенная для решения некоторых вопросов общей гигиены, санитарная микробиология развилась до уровня самостоятельной дисциплины. В настоящее время она представляет собой смежную с эпидемиологией и гигиеной область медицинской микробиологии. Сегодня вполне обоснованно санитарную микробиологию можно считать одним из важных разделов знаний об экологии микроорганизмов.

Современная санитарная микробиология призвана разрешать ряд задач, среди которых такие, как:

1.Разработка и оценка методов микробиологических и вирусологических исследований разнообразных объектов с использованием последних достижений естественных наук (микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, физики, химии и др.).

2. Анализ материалов, получаемых при массовых обследованиях однотипных объектов в разных условиях, и выработка на этой основе нормативов, по которым можно судить о соответствии микрофлоры среды и ее объектов гигиеническим требованиям. Согласование этих нормативов с общегигиеническими показателями (так как существование микроорганизмов неотделимо от других факторов окружающей среды).

3. Оценка путей воздействия человека и животных на окружающую среду, приводящих к ее загрязнению опасными для здоровья микроорганизмами. Нормальный взаимообмен микрофлорой между живыми существами и окружающей средой; различные отрасли человеческой деятельности, способные приводить к накоплению патогенных микроорганизмов и загрязнению ими тех или иных объектов; производственные и бытовые процессы, которые могут вызывать нарушение естественных природных процессов самоочищения.

4. Разработка рекомендаций по оздоравлению объектов окружающей среды путем воздействия на ее микрофлору и оценка эффективности проводимых мероприятий.

5. Изучение естественных процессов регуляции микробных биоценозов воды, почвы, атмосферы и закономерностей развития микроорганизмов на природных и искусственных объектах.

Цели и задачи санитарно-микробиологических исследований определяют своеобразие используемых методов. Основные санитарно-микробиологические методы включают как оригинальные методик, так и методы общей и медицинской микробиологии. Они направлены на определение общей микробной обсемененности (общее микробное число), обнаружение и титрование санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ), выявление патогенных микроорганизмов и их метаболитов, определение степени недоброкачественности изучаемых объектов, обусловленной наличием микроорганизмов.

Санитарно-показательные микроорганизмы окружающей среды и пищевых продуктов

К санитарно-показательным микроорганизмам (СПМ) относят представителей облигатной микрофлоры организма человека и теплокровных животных, обитающих в кишечнике или воздушно-дыхательных путях. В качестве таковых выступают не все представители нормальной микрофлоры человека и животных, а лишь те, которые удовлетворяют следующим основным требованиям:

1. Микроорганизм должен постоянно обитать в естественных полостях человека и животных и постоянно выделяться во внешнюю среду.

2. Микроорганизм не должен размножаться во внешней среде, исключая пищевые продукты, или размножаться незначительно и короткое время.

3. Длительность выживания микроорганизма во внешней среде должна быть не меньше, а несколько больше, чем сроки выживания патогенных микроорганизмов, выводимых из организма теми же путями.

4. У микроорганизма не должно быть во внешней среде «двойников» или аналогов, с которыми его можно перепутать.

5. Микроорганизм не должен сколько-нибудь значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде.

6. Рост санитарно-показательных микроорганизмов на питательных средах не должен зависеть от влияния других присутствующих микроорганизмов.

7. В объектах внешней среды санитарно-показательные микроорганизмы должны быть по возможности распределены равномерно.

8. Методы обнаружения, идентификации и количественного учета должны быть современными, простыми и легко доступными.

Предполагается, что чем больше обьъект загрязнен выделениями человека и животных, тем больше будет обнаружено СПМ и тем вероятнее присутствие патогенных микроорганизмов. Для более точной оценки в число СПМ включают и некоторые сапрофитные бактерии, которые в естественных условиях обитают вне организма человека и животных: аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, некоторные спорообразующие бактерии, актиномицеты, цианобактерии, целлюлозолитические бактерии, бделловибрионы, грибы и др. Выявление таких микроорганизмов может служить показателем процессов самоочищения.

Занятие № 1.

**Выделение микроорганизмов на питательных средах**

Микробиологическое исследование включает определение общего ко-

личества сапротрофных микроорганизмов, определение количества микро-

организмов различных эколого-трофических групп, определение микробов-

антагонистов и выявление их активности, определение санитарно-показательных микроорганизмов.

Для обеспечения роста микроорганизмов в искусственных условиях

используют питательные среды, которые должны соответствовать следую-

щим требованиям:

1) содержать все элементы, из которых строится клетка;

2) иметь достаточную влажность (не менее 20 % воды);

**ЗАИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

3) концентрация солей в среде должна обеспечить изотонию, т. е. соот-

ветствовать концентрации солей в микробной клетке (для большинства мик-

роорганизмов – 0,5 %; галофильных – 3 %);

4) концентрация водородных ионов (рН) среды должна быть оптимальной для выращиваемого организма (диапазон рН 4,5–8,5);

5) окислительно-восстановительный потенциал (Eh) среды, определяющий концентрацию кислорода в среде, должен соответствовать потребностям микроорганизма: для анаэробов – 0,12–0,06 В, для аэробов – более 0,08 В. Таким образом, должен соблюдаться принцип создания условий, адекватных природным (для данного микроорганизма);

6) кроме того, питательные среды, как и посуда, и другие материалы,

должны быть стерильными, поскольку успех микробиологических работ во

многом определяется созданием условий надежной стерильности.

Цель процесса стерилизации состоит в удалении или уничтожении

всех живых микроорганизмов внутри или на поверхности предмета. Процес-

сы стерилизации и дезинфекции основаны на действии все тех же биофизи-

ческих или физико-химических факторов: Т, Eh – аэрация, рН, гидростати-

ческое давление и др. Эффективность стерилизации выражается в виде ста-

тистической вероятности выживания клеток. По окончании процессов сте-

рилизации вероятность выживания клетки должна составлять не более 10–6.

Факторы, которые надо учитывать при выборе метода стерилизации:

1) конструкция и химический состав образца, подлежащего стерилизации;

2) биологическое (вегетативные клетки или споры) и физическое (влажность, сухие клетки более устойчивы к каким-либо воздействиям) состояние микроорганизмов в образцах, подлежащих стерилизации;

3) наследственная устойчивость микроорганизма к стерилизации и

скорость его гибели;

4) исходное количество микроорганизмов в стерилизуемом образце;

5) эффективность стерилизующего агента;

6) продолжительность стерилизующего воздействия.

В общем случае для стерилизации используются: 1) пар – культураль-

ные среды, оборудование, стеклянная посуда, 2) сухой жар – стеклянная по-

суда и металлическое оборудование, 3) газ – инструменты, 4) фильтрация –

растворы, 5) в особых случаях применяют радиоактивное облучение.

Воздействие влажным и сухим жаром имеет различный результат. Су-

хие клетки выдерживают нагревание до гораздо более высоких температур и

большее время, чем клетки влажные или в условиях полного насыщения во-

дяными парами (табл. 1).

Таблица 1

**Режимы и способы стерилизации**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Влажный жар | | Сухой жар | |
| Т, °С | Время стерилизации | Т, °С | Время стерилизации |
| 100 | 2,0 час | 120 | 8 час |
| 109 | 2,5 час | 140 | 2,5 час |
| 115 | 50 мин | 160 | 1 час |
| 121 | 15 мин | 170 | 25 мин |
| 126 | 10 мин | 180 | 10 мин |
| 134 | 3 мин |  |  |

**ЗАНТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

**Сухой жар** применяется для стерилизации стеклянной посуды (проби-

рок, колб, чашек Петри, пипеток), а также жиров, смазок, минерального

масла, восков, порошков. Для стерилизации сухим жаром используют сухо-

жаровые шкафы (печи Пастера).

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате

окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы

к сухому жару, чем вегетативные клетки.

**Стерилизацию паром** (влажным жаром) проводят в автоклаве с на-

сыщенным паром под давлением. Большинство автоклавов относится к гра-

витационным: пар движется в них сверху вниз под действием разности плот-

ностей воздуха и пара. Воздух из автоклава до начала стерилизации должен

быть полностью вытеснен паром. Присутствие воздуха приводит к тому, что

камера нагревается медленнее и до более низкой температуры.

Питательные среды, не содержащие углеводы, стерилизуют при 1 атм в

течение 15–20 мин, с углеводами – при 0,5 атм 15 мин.

Контроль температуры в стерилизационной камере осуществляется с

помощью порошкообразных химических веществ – индикаторов, имеющих определенную температуру плавления. Запаянные ампулы с порошками, смешанными с небольшим количеством красителя (метиленовая синь, фуксин, сафранин), помещают в камеру со стерилизуемым материалом. При достижении в камере определенной температуры порошки плавятся, образуя сплавы, окрашенные в цвет добавленной краски.

Показатели температуры плавления порошков-индикаторов:

Бензонафтол – 110 °С

Антипирин – 115 °С

Серный цвет – 115 °С

Резорцин чистый – 118 °С

Бензойная кислота – 121 °С.

На 100 г порошка-индикатора прибавляется 0,01 г сафранина, 0,005 г

фуксина или метиленовой сини.

Используют также бумажные полоски-тесты (термотесты) и биологи-

ческие индикаторы (БИ). БИ содержат известные концентрации микроорга-

низмов, обычно бактериальных спор, которые при определенном воздейст-

вии гибнут с прогнозируемой скоростью. БИ могут быть приготовлены на

различных носителях (фильтровальной бумаге, нитях или кусочках глины).

**Стерилизация текучим паром** (дробная стерилизация) производится

в аппарате Коха или автоклаве при незавинченной крышке и открытом вы**АНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

пускном кране. Аппарат Коха представляет собой металлический полый ци-

линдр с двойным дном. Пространство между верхней и нижней пластинкой

дна заполняют на 2/3 водой (для спуска оставшейся после стерилизации во-

ды имеется кран). Крышка аппарата конической формы имеет в центре от-

верстие для термометра и несколько небольших отверстий для выпуска пара.

Стерилизации текучим паром подвергаются в основном питательные среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100° (питательные среды с аммиачными солями, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Стерилизацию проводят по 15–30 мин в течение трех дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микробов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре, погибая при последующих прогреваниях.

**Тиндализация** – дробная стерилизация с применением температуры

ниже 100 °С, предложенная Тиндалем. Используется для стерилизации мате-

риалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сывортки, витами-

ны). Стерильность достигается повторным прогреванием объекта при темпе-

ратуре 60 °С по часу ежедневно в течение 5–6 дней подряд.

**Пастеризация** – частичная стерилизация многих пищевых продуктов

(вино, пиво, соки), проводится при 65–80° С в течение 10–60 мин (споры

микроорганизмов не уничтожаются).

**Стерилизация фильтрованием** применяется в тех случаях, когда по-

вышенная температура может резко повлиять на качество стерилизуемых

материалов (питательные среды, сыворотки, антибиотики), а также для очи-

щения бактериальных токсинов, фагов и различных продуктов жизнедея-

тельности бактерий. Как окончательный процесс фильтрование менее на-

дежно, чем стерилизация паром из-за большой вероятности прохождения

микроорганизмов через мембранные фильтры. Фильтры задерживают мик-

роорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания

раствора через фильтр требуется вакуум (создается, например, водоструй-

ными насосами) или давление (типа шприцев). Существуют два основных

типа фильтров – глубинные и мембранные. Глубинные фильтры состоят из

волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты

или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них

благодаря адсорбции и механическому захвату в матриксе фильтра. Имеют

большую емкость. Не имеют определенного размера пор. Мембранные

фильтры имеют непрерывную структуру, получают их из нитроклетчатки,

захват ими частиц определяется размером пор. Имеют низкую емкость, не-

прочные по сравнению с глубинными.

**Стерилизация излучением**. Излучение может быть неионизирующим

(инфракрасное, ультрафиолетовое, ультразвуковое, радиочастотное) и иони-

зирующим (β-частицы, рентгеновские лучи и γ -лучи). Ионизирующая радиа-

ция представляет собой воспроизводимый и надежный способ стерилизации.

**ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

Электронные ускорители употребляются для промышленной стерилизации

образцов с низкой плотностью, таких как хирургический шовный и перевя-

зочный материалы. Подобный способ стерилизации имеет ряд преимуществ:

он позволяет быстро облучать материалы на конвейере, еще на стадии их

производства.

γ-лучи: наиболее чувствительны к γ -облучению вегетативные клетки

бактерий, затем – плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и виру-

сы. γ -облучение успешно применяется для стерилизации таких предметов,

как больничные принадлежности, антибиотики, витамины, гормоны, стерои-

ды, пластмассовое разовое медицинское оборудование, одноразовые чашки

Петри, хирургический шовный и перевязочный материалы.

Ультрафиолетовое облучение имеет ограниченное применение из-за

малой проникающей способности. Особой чувствительностью к радиации

обладают нуклеиновые кислоты, особенно ДНК, поскольку максимум спек-

тра эффективного действия УФ совпадает с максимумом поглощения.

Радиочастотное облучение имеет ограничения: его летальное действие

видоспецифично, поэтому для уничтожения разных микроорганизмов могут

потребоваться различные частоты. Необходимо научиться управлять радио-

частотным облучением и обеспечить надежную безопасность персонала.

Эффективность облучения зависит от полученной дозы. Выбор дозы

определяется микробным загрязнением, а также формой и составом мате-

риала, подлежащего стерилизации. Единицей дозы облучения является рад,

который эквивалентен поглощенной энергии примерно в 100 эрг/г. Дозы

стерилизации обычно выражают в мегарадах (106 рад). Величина поглощен-

ной дозы может быть определена с помощью индикаторов, например, рас-

твора сульфата железа (FeSO4) и др.

**Химическая стерилизация** (газы). Газы для стерилизации применя-

ются в тех случаях, когда материалы и оборудование нельзя стерилизовать

другими способами. Чаще всего используют окись этилена и формальдегид.

Процесс стерилизации газом более сложно контролировать, чем другие спо-

собы стерилизации, поскольку он характеризуется множеством параметров.

**Чашечный метод Коха** широко используется для определения коли-

чества жизнеспособных микроорганизмов в почве и других естественных

субстратах. Применение его позволяет не только учесть численность микро-

организмов, но и оценить их разнообразие по морфологии колоний.

Почвенные образцы берут с помощью стерильной ложки, исследова-

ние проводится в день взятия образцов. Сущность метода заключается в высеве исследуемой пробы почвы на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. При этом считают, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа проводится в три приема: приготовление разведений, посев в чашки, подсчет выросших колоний.

Посев делают из разведений суспензии в зависимости от предполага-

мого количества микроорганизмов в исследуемом субстрате. Разведения **Е 7 еМА: ИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНШНЕЙ СРЕ**

делают в стерильной водопроводной воде или изотоническом растворе хлористого натрия. В ходе опыта используют постоянный коэффициент разведения. Чаще всего делают десятичные разведения.

Образец анализируемой почвы (1–10 г) помещают в колбу со 100 мл

стерильной воды и встряхивают. Затем переносят стерильной пипеткой 1 мл

исследуемого материала в пробирку с 9 мл стерильной воды. Если исследуе-

мый материал уже был разведен в 100 раз, получают разведение 1:1000. Сус-

пензию этого разведения тщательно перемешивают, вбирая в пипетку и вы-

пуская из нее полученную взвесь. Затем этой же пипеткой берут 1 мл полу-

ченного разведения и переносят его во вторую пробирку – получают разве-

дение 1:10000. Таким же образом готовят и последующие разведения. Сте-

пень разведения устанавливается предполагаемым количеством микроорга-

низмов в образце: число разведений тем больше, чем больше микроорганиз-

мов в исходном субстрате.

Посев производят на агаризованные среды в чашки Петри. Для опреде-

ления суммарной численности микроорганизмов используют мясопептон-

ный или рыбопептонный агар (МПА, РПА), для определения содержания

грибов в почве – сусло-агар (СА), для определения численности различных

физиологических групп и санитарно-показательных микроорганизмов ис-

пользуют соответствующие питательные среды. В стерильные чашки Петри

наливают расплавленную на водяной бане агаризованную среду, по 20–30 мл

в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока не засты-

нет агар. Стерильной пипеткой наносят определенный объем (обычно 0,1–

0,5 мл) соответствующего разведения, предварительно тщательно переме-

шанного, на поверхность агаровой пластинки в чашку Петри. Данный объем

распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Затем этим

шпателем проводят по всей поверхности среды во второй и третьей чашке,

куда посевной материал не вносили (метод истощающего посева).

Из каждого разведения делают 4–6 параллельных высевов. При парал-

лельных посевах одного разведения можно пользоваться одной стерильной

пипеткой и одним шпателем. Чашки с засеянными средами помещают в тер-

мостат, отрегулированный на температуру, благоприятную для развития вы-

являемых организмов. Подсчет бактерий производят при культивировании с

температурой 30 °С через трое суток, при комнатной температуре – через семь суток. Подсчет дрожжей и грибов – при комнатной температуре через 3–10 суток (при температуре 25 °С срок наблюдения за грибами может быть сокращен до 2–3 дней).

Подсчитывают количество колоний, выросших в чашке Петри, и де-

лают пересчет на 1 г. Результаты параллельных высевов суммируют и вычисляют среднее число колоний, выросших при высеве из этого разведения.

Колонии считают, не открывая чашки Петри.

Точность метода зависит от числа подсчитанных колоний, а не от чис-

ла повторений высевов. Лучшим разведением считают тот, при высеве из которого на плотной питательной среде возникает от 50 до 100 колоний. Если**ТЕ: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

число выросших колоний меньше 10, то эти результаты отбрасывают и для

расчета количества клеток в исходном субстрате не используют. Желательно,

чтобы общее количество подсчитанных колоний при высеве из данного раз-

ведения было не менее 300.

Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл) исходного субстрата вычис-

ляют по формуле

*T = a* × *b* × *c / d*,

где *T* – количество микроорганизмов в 1 г, *a* – количество подсчитанных колоний, *b* – разведение, из которого произведен высев, *c* – 10 (если на чашки высевали 0,1 мл суспензии), *d* – масса субстрата (почвы), взятого для анализа.

Статистическая обработка результатов возможна только при мини-

мальной технической ошибке, поэтому чашечный метод требует большой

чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тща-

тельно оберегать пипетки и среды от заражения посторонними микроорга-

низмами, так как случайно попавшая клетка может завысить число микроор-

ганизмов в исследуемой суспензии. Приготовление разведений и высевы

следует производить в боксе.

Описанный метод применим для учета аэробов и факультативных ана-

эробов. Для учета строгих анаэробов чашки Петри после посева помещают в

анаэробные условия.

**Экологические методы исследования почвенных микроорганизмов**

**Метод стекол обрастания** (по Росси–Холодному). Метод позволяет

наблюдать «микробные пейзажи». В небольшом почвенном разрезе одну из стенок зачищают и, сделав ножом вертикальную щель, закладывают в нее стерильные предметные стекла, плотно прижимая их к почве. Закапывают разрез, отмечая колышком местонахождение препаратов. Если почва содержит достаточно влаги, то закопанное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и минерального происхождения. В этой среде поселяются и активно развиваются различные микроорганизмы, образующие на стеклах характерные для данной почвы микропейзажи. По истечении срока экспозиции (не менее одного месяца) стекло осторожно отделяют от почвы (нескользящим движением), подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, препарат осторожно отмывают водой от крупных частиц почвы (для этого можно оставить стекло в стакане с водой в наклонном положении на несколько часов), окрашивают 1 %-ным карболовым эритрозином в течение 1 часа во влажной камере, промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Метод широко применяется в микробиологической практике.

С помощью этого метода впервые оказалось возможным наблюдение за рас-**АНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

пределением различных микроорганизмов в их природной среде обитания, наблюдение за формой и размерами группировок микроорганизмов, их взаимоотношениями.

Модификации метода заключаются в том, что стекла перед помещени-

ем в почву покрывают какой-нибудь питательной средой (крахмало-

аммиачным агаром, например, согласно модификации Рыбалкиной и Коно-

ненко) или специфическим субстратом (например, фильтровальной бумагой,

льняной тканью и т. д.).

**Метод капиллярных педоскопов**. В естественных условиях в почве,

илах развитие микроорганизмов происходит в основном в почвенных капил-

лярах, к стенкам которых прикрепляются почвенные микроорганизмы. Ис-

ходя из этого положения, Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе предложили исполь-

зовать для наблюдения за жизнью микроорганизмов плоские капилляры с

плоскопараллельными стенками. Был сконструирован специальный прибор –

педоскоп, состоящий из набора таких капилляров.

Стерильные педоскопы вставляют в почву с помощью специального

пробойника так, чтобы каналы ячеек приняли вертикальное положение, т.е.

соответствовали преобладающему направлению движения почвенного рас-

твора. Экспозиция педоскопов в почве длится обычно в течение месяца, по-

сле чего педоскопы вынимают из почвы, очищают снаружи от почвенных

частичек, рассматривают под микроскопом с иммерсионным объективом.

Микробные клетки в педоскопах могут быть зафиксированы и окрашены.

Фиксируют их в парах осмиевой кислоты или в парах 40 %-ного раствора формалина. Окрашивают 1 %-ным раствором карболового эритрозина, промывают водой.

Модификация метода, предложенная Т. В. Аристовской, состоит в том,

что внутренние стенки капилляров покрывают средой, содержащей фракцию

гуминовых кислот.

**Метод люминесцентно-микроскопического наблюдения** микроорга-

низмов в почвенных монолитах (по Звягинцеву). Готовят цилиндрическую

формочку (диаметр и высота по 1 см) из нержавеющей стали, пластмассы или стекла, имеющую острые края. Вдавливают формочку в почву исследуемого горизонта и осторожно вынимают ее так, чтобы над краями формочки возвышался слой почвы. Острой бритвой срезают почву, чтобы верхняя грань монолита была на уровне краев формочки. На поверхность почвы капают водный раствор акридинового оранжевого (1:1000) и накрывают ее очень тонким покровным стеклом (0,10–0,12 мм). Через 10–20 мин исследуют в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом (×90) в отраженном свете. Основные трудности метода заключаются в подборе подходящей концентрации красителя; для каждой почвы она подбирается опытным путем.

**Занятие № 2. Санитарно-микробиологическое исследование почвы.**

Почва – естественная среда обитания микроорганизмов. Характер почвы и видовой состав ее микрофлоры неразрывно связаны. Основное место

обитания микроорганизмов – твердая фаза, содержащая запасы питательных

веществ. До 90 % микроорганизмов находится в адсорбированном состоянии

на поверхности почвенных частиц.

Плотность микробного населения определяется, прежде всего, органи-

ческими веществами. Так, в 1 г чернозема содержится до 3 млрд клеток мик-

роорганизмов; в бедных органическими веществами подзолистых почвах –

от 300 млн до 2 млрд, в песках пустыни Сахары, где низкая влажность среды,

– около 1 млн.

Почвы различаются по содержанию воды: слишком сухие и слишком

влажные ограничивают рост и развитие микроорганизмов. Оптимальна для

большинства микроорганизмов влажность, равная 50–60 % максимальной

влагоемкости (наибольшего количества воды, которое почва может удержи-

вать). Некоторые, например *Clostridium pasteurianum*, могут расти при 100

%-й влагоемкости почвы. Для микроорганизмов важна концентрация солей в

почвенном растворе. Засоленные почвы беднее микроорганизмами, однако

некоторые грибы родов *Aspergillus, Peniclillium* хорошо развиваются на суб-

стратах с 20–30 % NaCl, некоторые почвенные микроорганизмы развиваются

при высоких концентрациях минеральных солей (осмофильные).

Почвенный воздух отличается по составу от атмосферного. Экологиче-

ски важным компонентом почвенного воздуха является количество СО2, не-

обходимого для автотрофных организмов. При растворении в воде он обра-

зует кислоту и, изменяя рН почвы, становится фактором, ограничивающим

жизненные процессы микроорганизмов. Например, гриб *Rhizoctonia solani*

погибает при концентрации СО2 10 %. Почвенные микроорганизмы очень

чувствительны к изменениям рН среды: грибы лучше растут в кислой среде,

а бактерии – в нейтральной или слегка щелочной. Изменение рН почвы вы-

зывает изменения в популяциях почвенных микроорганизмов.

Из внешних факторов, существенно влияющих на развитие микроорга-

низмов в почве, основным является температура. Лучше всего почвенные

микроорганизмы развиваются при температуре 15–25 °С, но могут встре-

чаться термофильные (оптимум 50 °С) и криофильные, развивающиеся при

температуре, близкой к 0 °С. Микроорганизмы обитают главным образом в

**ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙРЕДЫ.**

самом верхнем аккумулятивном, или перегнойном, горизонте почвенного

профиля, отличающегося большой амплитудой колебаний температур, зави-

сящей от времени года, характера местности и даже от времени суток, от

температуры воздуха, поэтому почвенные микроорганизмы обладают боль-

шой пластичностью в отношении температур.

Почвенные микроорганизмы неодинаково распространены по горизон-

там почвы. Наибольшее количество микроорганизмов обитает в верхнем 10-

сантиметровом слое почвы. В нижних горизонтах органических веществ ма-

ло и большинство бактерий находится в покоящемся состоянии, в основном

в виде цист и спор. Чем глубже расположен горизонт почвы, тем меньше в

нем микроорганизмов.

На распределение микроорганизмов в почве влияют корни растений, выделяющие во внешнюю среду органические вещества. На поверхности корней и в прикорневой зоне сосредоточено большое количество микроорганизмов.

Наиболее многочисленной группой среди микроорганизмов всех типов

почв являются бактерии, составляющие от 65 до 96 % общего числа клеток.

В почвах, богатых гумусом (дерново-подзолистых, лесных и горно-луговых), влажных и холодных, преобладают неспорообразующие формы. В бурых и пустынных почвах с низким содержанием органических веществ и влаги при высокой температуре развиваются преимущественно споровые бактерии, более устойчивые к действию засухи и перегрева.

Количество грибов в почве не превышает 0,5–0,8 % общего числа микроорганизмов и зависит от рН почвы. В сильно кислых подзолистых почвах (при рН около 4) грибы составляют до 3 % всех микроорганизмов.

Различные виды обработки почв (рыхление, орошение, вспашка, внесение удобрений) способствуют усиленному размножению микроорганизмов, поэтому в окультуренных почвах число их в несколько раз

больше, чем в целинных.

Из микробиологических процессов, происходящих в почве, наибольшее значение имеют минерализация растительных и животных ос-татков, образование гумуса и его разложение. В растительном опаде содержатся сахара, аминокислоты, белки, которые быстро потребляются микроорганизмами. Минерализация нерастворимых в воде соединений (целлюлозы, гемицеллюлозы) идет медленно, с участием немногих видов, прежде всего грибов. Лигнин – главный исходный продукт д ля образования гумуса – наиболее устойчивое соединение и разлагается микроорганизмами очень медленно – месяцы и годы.

Почвенные микроорганизмы условно подразделяются на несколько

групп. Микроорганизмы, разлагающе свежий растительный опад, С. Н. Ви-ноградский назвал зимогенной микрофлорой. В основном это бактерии родов *Bacillus, Pseudomonas* и др. Если в почве мало легкоразлагаемых питательных веществ, зимогенные микроорганизмы переходят в покоящуюся

**ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.**

форму или даже погибают.

Автохтонные микроорганизмы постоянно живут в почве, и численность их не зависит от поступления легкодоступных питательных веществ.

Характерный представитель этой группы – бактерии рода *Arthrobacter*. Автохтонные микроорганизмы принимают активное участие в синтезе гумуса (автохтонная микрофлора А) и его распаде (автохтонная микрофлора Б).

Олиготрофные микроорганизмы – виды, способные усваивать питательные вещества из растворов с низкой концентрацией. Это бактерии родов *Microcyclus*, *Hyphomicrobium*, *Agrobacter*, *Caulobacter* и др.

Хемолитоавтотрофные бактерии – почвенные микроорганизмы, окисляющие неорганические субстраты. Группа включает нитрифицируюшие, тионовые, водородные, железобактерии и др.

В разных типах почв соотношение групп бактерий неодинаково, изме-

няется и видовой состав представителей различных групп. Количественные

показатели содержания микроорганизмов зависят от метода исследования.

Почва подвергается колоссальному антропогенному воздействию, по-

ступающие в почву загрязнители оказывают неблагоприятное воздействие на

свойства почвы, ее плодородие, урожайность возделываемых культур. Боль-

шую угрозу для почвы представляют загрязнения нефтью. Кроме того, суще-

ствуют и другие весьма опасные для почвы типы загрязнений. Почва – есте-

ственное депо, где накапливаются остатки пестицидов, тяжелые металлы

поглощаются почвенными частицами и оказывают пагубное влияние на ор-

ганизмы, живущие в почве. Стойкие пестициды накапливаются в почве и за-

грязняют окружающую среду и сельскохозяйственную продукцию. Иногда

при их частичном разрушении образуются соединения, гораздо более ток-

сичные и устойчивые, чем внесенные препараты. Однако и сама почва можетслужить местом очистки различного рода загрязнений; ее самоочищение в значительной степени зависит от деятельности почвенных микроорганизмов.

На основе комменсализма и в условиях кометаболизма, или соокисления, может происходить полная минерализация загрязняющих органических веществ в почве.

В практике сравнительно редко встречается возможность прямой ко-

**НЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ** личественной оценки опасной микрофлоры, гораздо чаще приходится при-

бегать к косвенному методу – определению суммарного микробного обсеме-

нения того или иного объекта. При этом исходят из предположения о том,

что вероятность проникновения в объект потенциально опасной микрофло-

ры будет тем выше, чем большими окажутся величины «микробного числа».

Логическая обоснованность этой гипотезы не вызывает сомнений, но в

природных условиях она правильна лишь в статистическом плане. Критерий

суммарного микробного обсеменения объектов внешней среды служит осно-

ванием только для приближенных, относительных оценок. Тем не менее

этот показатель имеет определенную сравнительную ценность и поэтому

широко используется в санитарно-микробиологической практике.

Почвы считаются чистыми, если в 1 г почвы содержатся десятки тысяч

микроорганизмов; умеренно загрязненными, если содержатся сотни тысяч, и

грязными – если миллионы.

Далее определяют содержание в почве кишечной палочки. В санитар-

но-гигиеническом отношении важно не только зарегистрировать факт нали-

чия кишечной палочки в том или ином субстрате, но важно учесть и количе-

ственную сторону данного явления. Это необходимо для суждения об интен-

сивности фекального загрязнения. Для этой цели служат два показателя: ко-

ли-титр и коли-индекс.

Под титром кишечной палочки понимают наименьшее количество ис-

следуемого материала, в котором обнаруживается одна кишечная палочка.

Титр кишечной палочки выражают для жидкостей в миллилитрах или долях

миллилитра, для твердых субстратов – в граммах или долях грамма. Коли-

индекс – это количество особей кишечной палочки, обнаруженное в опреде-

ленном объеме исследуемого объекта.

Численность кишечной палочки определяют методом разведений при

высеве на дифференциально-диагностическую среду Эндо.

Другим наиболее удобным методом для вычисления коли-индекса является метод мембранных фильтров. Готовят суспензию почвы 1:10 и ее разведения 1:100 и 1:1000.

1 мл взвеси вносят в стерильную пробирку с 50 мл воды и фильтруют через мембранные фильтры № 2 или № 3. Для удаления из взвеси крупных частиц проводят предварительную фильтрацию через фильтр № 6. После этого фильтры выкладывают на среду Эндо и инкубируют в течение 24 часов при температуре 37 °С. Проводят подсчет выросших колоний кишечной палочки и с учетом разведения делают пересчет на 1 г почвы. После установления коли-индекса определяют коли-титр по формуле

коли-титр = 1/ коли-индекс.

По коли-индексу судят о чистоте почвы. Чистая почва не содержит ни

одной кишечной палочки на 1 г почвы; слабозагрязненная – 10–100; умерен-

но загрязненная – 100–1000; сильнозагрязненная – более 1000.

**Занятие 3.**

**Санитарно-микробиологическое исследование воды**

**Общая характеристика микрофлоры воды**

Типичными водными экосистемами являются океаны, моря, озера, пруды и проточные водоемы. Вода – естественная среда обитания микроорганизмов.

Микрофлора природных вод различается по качественному и количественному составу. В большинстве это сапротрофы, но могут встречаться патогенные и условно патогенные виды. В основном это бактерии овальной и цилиндрической формы, среди которых преобладают пигментообразующие кокки, присутствуют микроорганизмы, встречающиеся в почве, где расположены водоемы.

Каждый водоем имеет характерные особенности распределения микроорганизмов как по вертикали, так и по горизонтали. В количественном отношении содержание их достаточно велико. В морской воде и иле пресно-

водных водоемов от 10 млн. до 3 млрд. клеток в 1 мл. Основная масса распо-

ложена в прибрежных зонах. На глубине 1 км встречаются единичные пред-

ставители, а до 4 км они практически отсутствуют.

Подземные воды, родниковые и воды глубоких артезианских колодцев содержат единичные микробные клетки. Подземные воды обычных колодцев содержат значительное количество микроорганизмов; чем ближе к поверхности расположены грунтовые воды, тем обильнее их микрофлора.

В воде открытых водоемов (поверхностные воды) количество микроорганизмов изменяется в зависимости от метеоусловий и времени года. Зимой микрофлора воды в 4–12 раз беднее, чем летом.

В вертикальном направлении микроорганизмы распределены в воде более равномерно, чем в почве. На глубине 21 м микроорганизмов только в 2

раза меньше, чем на глубине 3 м.

В сточных водах содержится много биогенных фосфор-, углерод-, азотсодержащих соединений, которые попадают в водоемы. По мере удаления от населенных пунктов и предприятий, содержание органики и количество микроорганизмов в воде уменьшается. Этот процесс называется самоочищением воды. Основную роль в самоочищении вод от органических,

синтетических веществ играют сапротрофные микроорганизмы, грибы, гид-

робионты, высшие растения. При этом микроорганизмы обладают высокой

пластичностью, имеют мощные ферментные системы, благодаря которым

загрязняющие вещества минерализуются и разрушаются.

Установлено, что под влиянием загрязняющих веществ в пресноводных экосистемах отмечается падение их устойчивости вследствие нарушения пищевой пирамиды и ломки сигнальных связей в биоценозе, микробиологического загрязнения, эвтрофирования и других крайне неблагоприятных процессов.

Сапробность – комплекс особенностей водоема, отличающихся степе-

нью загрязненности органическими веществами и определяющих развитие

соответствующих организмов в воде. Различают три типа сапробности.

1. Полисапробная зона – сильно загрязненная, характеризуется боль-**АНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

шим количеством высокомолекулярных органических соединений, незначительным содержанием кислорода. Преобладают анаэробные бактерии, вызывающие гниение и брожение. В 1 мл воды содержится несколько миллионов бактерий.

2. Мезосапробная зона – умеренно загрязненная. Идут интенсивные процессы минерализации, но преобладают окислительные процессы. За счет

минерализации органических веществ уменьшается количество сапротрофных бактерий. В этой зоне содержатся аммиак и метан.

3. Олигосапробная зона – зона чистой воды, органических веществ нет,

окислительные процессы прекращаются. Численность бактерий снижается до 10–100 кл/мл.

В естественных незагрязненных проточных водоемах часто бывает так

мало одноклеточных организмов, что вода кажется кристально прозрачной.

Состав микрофлоры и микрофауны в водоеме служит хорошим индикатором степени его загрязнения. Если в водоеме еще встречаются дафнии – значит, вода чистая. Присутствие *Sphaerotilus natans* указывает на сильное загрязнение органическими веществами, а запах сероводорода свидетельствует об анаэробной сульфатредукции, т. е. служит сигналом тревоги.

Интенсивность и направленность микробиологических процессов зависит от температуры и содержания в воде молекулярного кислорода. В зависимости от количества кислорода в водоемах выделяют три зоны.

1. Аэробная – поверхностная зона, содержит много кислорода. Ее населяют водоросли и микроорганизмы, осуществляющие процессы минерализации: *Pseudomonas, Artrobacter*, миксобактерии. Толщина слоя зависит от количества органики. Если органических веществ мало, то аэробы растут медленно, кислород проходит вглубь и зона увеличивается. Если органики много, то происходит быстрый рост микроорганизмов и кислород не проходит.

2. Анаэробная – содержит мало кислорода. Обитают факультативные и облигатные анаэробы. Нет процесса нитрификации – выделяется аммиак, вода бедна нитратами. Выделяется много метана. Если содержится много сульфатов, то образуется сероводород. Если мало сульфатов, то сероводород образуется за счет расщепления серосодержащих аминокислот. В этой зоне обнаруживаются пурпурные и зеленые серобактерии, сульфатредуцирующие бактерии, можно найти формы, обладающие газовыми вакуолями, такие как: *Lamprocystis, Amoebobacter, Thiodictyon, Thiopedia, Pelodictyon* и *Ancalochloris*, а также передвигающиеся с помощью жгутиков виды *Chromatium* и *Thiospirillum*.

3. Микроаэрофильная – промежуточная между первой и второй. Сверху немного кислорода, снизу – метан, аммиак, окислы металлов. Обитают хемолитоавтотрофы: водород-, метан-, железоокисляющие бактерии. Для зоны также характерна высокая биологическая активность. Здесь развиваются некоторые цианобактерии, способные переносить присутствие сероводорода и отсутствие О2, в том числе *Oscillatoria limnetica*.

**ЗАТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**Скорость использования веществ в анаэробных условиях невысока.

При этом накапливаются продукты брожения, которые ингибируют последующие процессы разложения органики, и она оседает на дно.

**Методы исследования воды**

При санитарно-микробиологическом исследовании воды определяют микробное число (численность микроорганизмов в 1 мл), коли-титр или коли-индекс в 1 л воды и наличие энтерококков в 50 мл воды. При специальном санитарно-микробиологическом исследовании воды наряду с этим учитывают патогенные микроорганизмы: возбудителей дизентерии, брюшного тифа, паратифа А, Б и холеры.

Установление микробного числа проводят методом культивирования или методом фильтрации с использованием мембранных фильтров. Последний является более точным. При определении микробного числа методом культивирования делают посев воды на МПА.

Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, из естественных водоемов для засева используют разведения 1:10, 1:100 и 1:1000. Посевы инкубируют при 37 °С в течение двух суток, ведут подсчет выросших колоний в чашках и делают пересчет количества микроорганизмов на 1 мл воды.

Вода считается хорошего качества, если число микроорганизмов менее 100 на 1 мл воды, сомнительной – 100–150 микроорганизмов на 1 мл, загрязненной – 150–500 микроорганизмов на 1 мл, грязной – более 500 микроорганизмов на 1 мл воды. Вода, содержащая в 1 мл 100 и более микроорганизмов, считается непригодной для питья.

После установления общего микробного числа определяют бактерии группы кишечной палочки. У нас в стране действуют следующие нормативы для питьевой воды централизованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.1074–01, для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.544–96, согласно которым допускается не более трех кишечных палочек на 1000 мл воды. По международному стандарту вода считается превосходной, когда в 100 мл воды нет ни одной кишечной палочки; удовлетворительной – одна–три кишечные палочки; сомнительного качества – четыре–десять и неудовлетворительного качества – более десяти кишечных палочек.

Кишечные палочки в санитарной микробиологии воды используются в

качестве: показателя чистоты; индикатора фекального загрязнения воды; косвенного показателя загрязнения воды патогенными микроорганизмами – возбудителями кишечных инфекций.

После обнаружения кишечной палочки в воде определяют энтерококки. В качестве санитарно-показательных используется два вида стрептококков: *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*.

Через мембранный фильтр пропускают 50 мл воды и мембранные фильтры выкладывают на агаризованные диагностические среды. Для обнаружения энтерококков используют среды, содержащие 40 % желчи (рН 9.6–10.2) или среды с азидом натрия и азидом калия.

**ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**На этих средах колонии энтерококков имеют черный цвет. По ГОСТу в питьевой воде не должно содержаться ни одного энтерококка в 50 мл воды.

**Занятие 4.**

**Санитарно-микробиологическое исследование воздуха**

Воздух не является местом обитания микроорганизмов, но служит ме-

стом их повсеместного распространения: там, куда поступает воздух, могут

быть и микроорганизмы. Обилие солнечных лучей приводит к их массовой

гибели, а отсутствие источников питания исключает возможность размноже-

ния. Однако в атмосфере всегда содержится определенное количество жиз-

неспособных клеток, которые вместе с пылью поднимаются в воздух, а затем

вновь оседают на поверхность земли. Повсеместное распространение микро-

организмов воздушными потоками составляет часть так называемой микро-

биологии атмосферы. Фактор географической изоляции, столь важный для

животных и растений, для бактерий и грибов практически не имеет значе-

ния.

В составе твердых частиц в аэрозолях всегда присутствуют микроорга-

низмы. Над сушей это главным образом споры грибов, над морем – преиму-

щественно бактерии. В воздухе над крупными городами микроорганизмов

гораздо больше, чем в сельской местности или в лесу; летом больше, чем зи-

мой. Особенно чистый воздух над морями, горами, ледяными полями Арк-

тики и Антарктиды, где в 1 м3 воздуха содержатся единичные клетки.

Количество микроорганизмов в воздухе уменьшается по мере удаления

от поверхности земли. Верхняя граница жизни пока не установлена.

Видовой состав микрофлоры атмосферы носит случайный характер и

потому сильно колеблется. Среди микроорганизмов преобладают пигмент-

ные формы стрептококков, сарцин и дрожжей, которые более устойчивы (за

счет наличия каротиноидов) к ультрафиолетовым лучам, а также споры бак-

терий и грибов.

Очень богат микроорганизмами воздух закрытых помещений, особен-

но таких, где неизбежно массовое хождение людей, сопровождающееся под-

нятием пыли. Например, в школах до занятий численность бактерий обычно

не превышает 2 тыс. в 1 м3, а после занятия – десятки тысяч.

В воздухе жилых помещений, поликлиник и больниц обнаруживаются

в значительном количестве болезнетворные микроорганизмы, которые неус-

тойчивы к действию света и высушиванию, поэтому большинство из них

гибнет. Однако туберкулезные палочки, патогенные стрептококки и стафи-

лококки хорошо переносят высушивание, в связи с этим воздух может быть

источником инфекционных заболеваний.

**Санитарно-микробиологический анализ воздуха**

Санитарная оценка воздуха помещения осуществляется по двум мик-

робиологическим показателям: общему количеству бактерий и количеству

санитарно-показательных микроорганизмов в 1м3 воздуха. Для обнаружения

**ЗАНЯИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

микроорганизмов в воздухе предложено большое количество методов и при-

боров, позволяющих определять как общее количество, так и состав микро-

флоры. В основу методов положены два принципа: оседание (седиментация)

и засасывание (аспирация). Простейший – метод Коха, основанный на осе-

дании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы

тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Метод Кротова осно-

ван на ударно-прибивном действии струи исследуемого воздуха, проводится

с помощью прибора Кротова.

Ни один из предложенных методов не позволяет уловить и подсчитать

все микроорганизмы, лучше использовать сочетание нескольких методов.

Бактериальная загрязненность воздуха определяется по количеству ко-

лоний, выросших в чашках Петри на МПА. В. Л. Омельянским установлено,

что за 5 минут при спокойном состоянии воздуха на площадь в 100 см2 осе-

дает приблизительно столько микроорганизмов, сколько их содержится в

10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количе-

ство выросших на ней колоний микробов, можно определить количество

микроорганизмов, содержащихся в 1м3 воздуха.

Критерии чистоты воздуха следующие: в воздухе операционных не до-

пускается присутствие микроорганизмов. Микробное число для пищевых

учреждений – не более 500 клеток в 1м3, для жилых помещений – до 1500

клеток в 1м3.

Санитарно-показательными микроорганизмами для оценки чистоты

воздуха служат гемолитические стрептококки и стафилококки – постоянные

обитатели верхних дыхательных путей, слизистой носа и ротовой полости

человека. Это *Streptococcus viridans* – зеленящий \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_стрептококк, *Streptococcus*

*haemolyticus* – гемолитический стрептококк и *Staphylococcus aureus* – золо-

тистый стафилококк.

В качестве диагностической среды для их выявления используют кро-

вяной агар. Зеленящий стрептококк имеет вокруг выросших колоний поло-

жительную зону неполного просветления с позеленением среды. Гемолити-

ческий стрептококк образует на поверхности кровяного агара колонии, ок-

руженные зоной гемолиза.

Воздух считается чистым, если в 1м3 воздуха содержится летом не

более 4 стрептококков, зимой – не более 16. Загрязненным воздух считает-

ся, если в 1м3 воздуха содержится летом более 32 стрептококков, зимой –

более 56. Золотистый стафилококк используется в качестве санитарно-

показательного микроорганизма в хирургических палатах и родильных до-

мах. В 250 л воздуха не должно содержаться ни одного стафилококка.

Задание

1. Определить общее микробное число для воды из водопроводной се-

ти и аквариума.

2. Определить общее микробное число для воздуха в помещении методом Коха.

**ЗАНЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

3. Оценить санитарно-микробиологическое состояние анализируемых

объектов.

План выполнения работы

Посев микроорганизмов на чашки Петри (2 часа)

1. Разлить расплавленную и остуженную до 45–50 °С питательную

среду в стерильные чашки Петри. После застывания агара чашку Петри от-

крыть полностью и выдержать в течение 5 минут в исследуемом помещении.

Затем чашку закрыть, поместить дном вверх в термостат и культивировать 5–

7 дней при 27–30 °С.

2. Для определения количества микроорганизмов в 1 мл аквариумной

воды приготовить 10-кратное разведение от 1:10 до 1:1000. Затем 0,1 мл из

соответствующего разведения, начиная с большего, внести в стерильные

чашки Петри с застывшей агаризованной средой и шпателем равномерно

распределить по поверхности. Чашки культивировать в термостате вверх

дном при температуре 27–30 °С.

3. Аналогично провести посев микроорганизмов из водопроводной во-

ды. Для этого отобрать пробу воды в стерильную колбу и внести 0,1 мл в

чашки с застывшей агаризованной средой.

Количественный учет микроорганизмов и оценка санитарного состоя-

ния воды и воздуха (2 часа):

1. Для определения общего микробного числа в анализируемом возду-

хе и пробах воды подсчитать количество выросших колоний на чашках и

сделать пересчет на 1 м3 воздуха и 1 мл воды. Оценить степень чистоты воз-

духа и качество воды по нормативам общего микробного числа.

2. Провести анализ выросших колоний: подсчитать количество бакте-

рий и грибов, пигментированных бактерий, споровых и неспоровых форм.

Приготовить прижизненные препараты из некоторых колоний, промикро-

скопировать. Ознакомиться с морфологией клеток (форма, подвижность,

взаимное расположение), зарисовать.

Вопросы для самостоятельного контроля

1. Какие факторы оказывают влияние на развитие микроорга-

низмов в почве?

2. Какими признаками характеризуются аллохтонные и автохтонные

микроорганизмы? Кем было предложено такое разделение?

3. Какие факторы оказывают влияние на численность микроорганиз-

мов в водоемах?

4. Какие виды загрязнений почвы и воды относятся к наиболее опас-

ным? Как происходит самоочищение почвы и воды?

5. Как можно определить численность микроорганизмов в почве?

6. Как проводится санитарно-микробиологический анализ воды?

**ЯТИЕ 17 ТЕМА: МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

7. Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Что

они характеризуют?

8. Какие показатели характеризуют чистоту водоемов и питьевой во-

ды?

9. Какие микроорганизмы могут присутствовать в воздухе? Как опре-

делить их количество?

10. Какие существуют критерии чистоты воздуха?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алешукина, А. В. Медицинская микробиология : учеб. пособие /

А. В. Алешукина. – Ростов н/Д : Феникс, 2003. – 473 с.

2. Аникиев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробио-

логии : учеб. пособие для биологических специальностей педагогических

институтов : допущено Министерством просвещения СССР / В. В. Аникиев,

К. А. Лукомская. – 2-е изд. – М. : Просвещение, 1983 . – 127 с.

3. Асонов, Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М. : Колос,

2001. – 342 с.

4. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей /

И. П. Бабьева, В. И. Голубев. – М. : Пищевая пром-сть, 1979. – 132 с.

5. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммуно-\_\_