**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 пресноводных водоемов от 10 млн. до 3 млрд. клеток в 1 мл. Основная масса расположена в прибрежных зонах. На глубине 1 км встречаются единичные представители, 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, гидробионты, 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 степенью загрязненности органическими веществами и определяющих развитие соответствующих организмов в воде. Различают три типа сапробности.

1. Полисапробная зона – сильно загрязненная, характеризуется большим 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*.

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. На этих средах колонии энтерококков имеют черный цвет. По ГОСТу в питьевой воде не должно содержаться ни одного энтерококка в 50 мл воды.

**Отбор проб воды**

Для отбора проб используют специально предназначенную для этих целей: одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов. Емкости оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми) и защитным колпачком. Многоразовая посуда и пробки должны выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием. При отборе проб в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для бактериологических исследований.

Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб воды с указанием места, даты, времени забора, фамилии специалиста, отбиравшего пробу и цели исследования. Указывают особые обстоятельства: глубину отбора, условия транспортировки, время спуска воды из крана и т.д.

Доставку проб питьевой воды осуществляют в контейнерах-холодильниках при температуре 4-100 С. При соблюдении указанных условий срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 ч.

**Определение микробного числа воды**

С флаконов с пробкой снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают. Из каждой пробы делают посев с таким расчетом, чтобы число выросших на чашках колоний колебалось в пределах от 30 до 300.

По 1 мл каждого разведения вносят в 2 стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-500С МПА (РПА), который тщательно круговыми движениями перемешивают. Среде дают застыть и инкубируют при 370С. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 370С в течение суток, а другую – 2 суток при 200С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и глубине среды колоний и вычисляют микробное число воды – количество микроорганизмов в 1 мл.

**Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий**

К общим термотолерантным бактериям (ОКБ) относятся аэробные и факультативно-анаэробные не образующие спор грамотрицательные оксидазоотрицательные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37(±1)0С в течение 24-48 ч. Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) в дополнение к вышеперечисленному сбраживают лактозу до кислоты и газа при 44(±0,5)0С в течение 24 ч.

ОКБ и ТКБ определяют титрационным (бродильным) и мембранными методами. Арбитражным является метод мембранной фильтрации.

Задания для самостоятельной подготовки по теме занятия.

1. Описать проведение титрационного (бродильного)метода определения ОКБ и ТКБ
2. Записать рецепты питательных сред: МПА, глюкозо-петонной среды, среды Эндо, железо-сульфитного агара (среды Вильсон-Блера), энтерококковый агар, желточно-солевой агар.
3. Знать последователльность этапов проведения санитарно-микробиологических исследований воды