

**Санитарно-
бактериологическое
исследование воды, воздуха
и внешней среды ЛПУ**

Санитарное состояние объектов внешней среды определяют по двум основным показателям:

- **общее микробное число** – общее количество микроорганизмов в единице объема или массы исследуемой среды;
- **санитарно-показательные микроорганизмы (или индикаторные микроорганизмы)** – косвенный показатель возможного присутствия патогенных микроорганизмов, которые попадают во внешнюю среду из организмов человека, животных и птиц. Для разных объектов внешней среды выбраны определенные виды микроорганизмов.

Критерии выбора индикаторных микроорганизмов:

- Являются представителями нормальной микрофлоры.
- Постоянно выделяются из организма в больших количествах.
- Не имеют других мест обитания.
- Сохраняются во внешней среде в те же сроки, что и патогенные.
- Не размножаются вне организма.
- Не должны вызывать методических сложностей при выделении в чистую культуру (обнаружении).

Санитарно-показательные микроорганизмы воды –

это бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Они также называются колиформными (от лат. *Escherichia coli* - кишечная палочка.) Эта группа объединяет факультативно анаэробных представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

При санитарно-бактериологическом исследовании воды определяют:

- ***общее микробное число (общее количество микроорганизмов в 1 мл),***
- ***наличие патогенных микроорганизмов,***
- ***количество БГКП как показатель степени фекального загрязнения***

Для оценки санитарного состояния воздуха закрытых помещений определяют:

общее микробное число,

количество санитарно-показательных микроорганизмов, к которым относятся гемолитические стафилококки, α - и β -гемолитические стрептококки.

Санитарное состояние почвы оценивают на основании нескольких показателей:

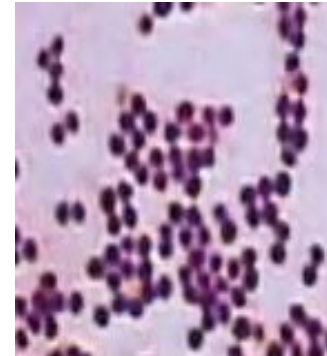
- содержания общего количества микроорганизмов (общее микробное число),
- наличия санитарно-показательных микроорганизмов.

Для почвы **санитарно-показательными организмами** служат бактерии группы кишечной палочки (БГКП или колиформные), фекальные энтерококки, *Clostridium perfringens*, термофильные бактерии, *Proteus spp.*

Выделение чистой культуры бактерий-аэробов, 3-й день исследования

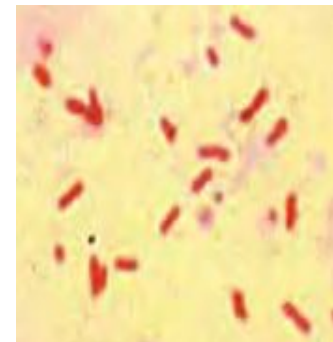
1 этап - приготовление мазка из изучаемой колонии и его окраска по Граму.

- Приготовлен мазок из колонии, выросшей на ЖСА. Колония желтого цвета, гладкая, округлая, ровный край, окружена перламутровым «венчиком».



- Вывод: чистая культура, Г+ кокки

- Приготовлен мазок из колонии, выросшей на среде Эндо. Колония темно-красного цвета с металлическим блеском, гладкая, округлая, ровный край.



- Вывод: чистая культура, Г- палочки.

- 2 этап – посев выделенных чистых культур на среды Гисса и Олькеницкого для определения биохимических свойств.

Среда Олькеницкого (трехсахарная среда с мочевиной):

- 1 г лактозы, 1 г сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1 г мочевины, 0,02 г соли Мора (аммоний-железо (II) сульфат), 0,03 г гипосульфита, МПА, 0,4 мл 0,5% р-ра фенолового красного.

Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

Культуру засевают уколом в столбик и штрихом по скошенной поверхности. Инкубируют при 37 °С 18 - 20 часов.

Ферментация углеводов (кислотообразование) вызывает появление желтой окраски, разложение мочевины (увеличение рН) - покраснение; образование сероводорода приводит к почернению в столбике.

Выделение чистой культуры бактерий-аэробов, 4-й день исследования

Учёт результатов определения биохимической активности аэробных бактерий на средах Гисса и Олькеницкого:

- Культура № 1 (Г+ кокки): разлагают лактозу, глюкозу, мальтозу, левулезу, сахарозу до кислоты.

Вывод: выделена чистая культура *Staphylococcus aureus*.

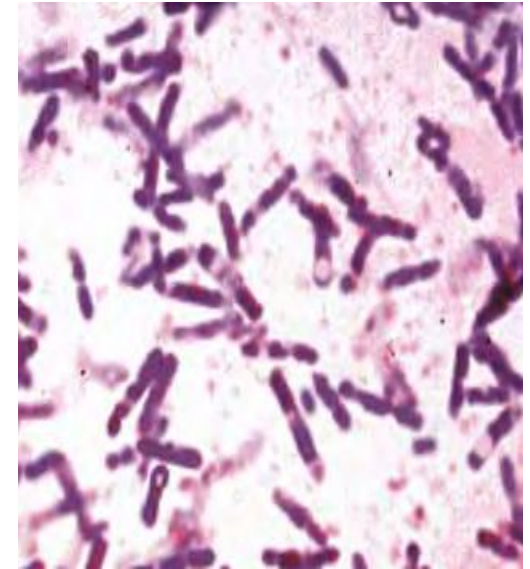
- Культура № 2 (Г- палочки): разлагают глюкозу, маннит, арабинозу, лактозу до кислоты и газа, сероводород не выделяют, мочевины не разлагают.

Вывод: выделена чистая культура *Escherichia coli*.

Выделение чистой культуры бактерий-анаэробов по методу Вейнберга (4-й день исследования)

Метод Вейнберга: исследуемый материал засевают в расплавленную и охлажденную до 45-50 ° С агаризированную питательную среду. Среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды.

Пробирки инкубируют в термостате, а затем изучают выросшие колонии. При обнаружении интересующей колонии на её месте делают распил, материал быстро отбирают и засеивают на среду Китта-Тароцци (с последующим контролем чистоты выделенной культуры).



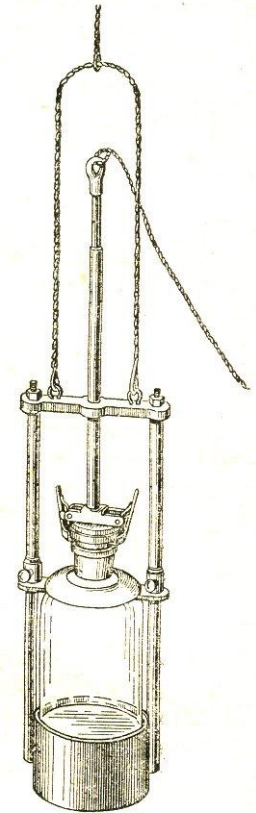
1 этап - приготовление мазка из изучаемой колонии и его окраска по Граму.

- Вывод: выделена чистая культура Г+ спорообразующих палочек, предположительно *Clostridium perfringens*, культура требует дальнейшей идентификации.

Определение ОМЧ водопроводной воды (1-й день исследования)

Отбор проб:

- Для взятия проб воды используют стерильную посуду.
- Перед взятием проб из водопровода кран протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают, после чего 10-15 мин сливают застоявшуюся в трубах воду и только затем отбирают образец для исследования.
- Анализ проводят сразу после взятия проб. При необходимости транспортировки воду сохраняют при температуре 1-5° С и анализируют не позднее чем через 2-6 ч с момента ее забора.
- Для взятия проб из глубины открытых водоемов используют специальный аппарат – батометр. Он состоит из металлического каркаса, в который вставляется бутылка для воды, закрываемая плотной пробкой с приспособлением для ее открывания. Батометр укреплен на тросе, позволяющем опускать его на нужную глубину.



- Общее микробное число воды определяют путем культивирования содержащихся в пробах бактерий в плотных питательных средах.
- По 1 мл воды вносят в 2 чашки Петри и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА. Содержимое чашек тщательно перемешивают круговыми движениями, перемещая их по поверхности стола. После застывания агара, чашки помещают в термостат на 24 ч при температуре 37°C.

2-й день исследования:

- Колонии бактерий растут, как на поверхности питательной среды (аэробы), так и в ее глубине (анаэробы). Подсчитывают их суммарное количество и вычисляют общее микробное число.
- **Например**, на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 27 колоний, на второй – 18, т.е. в среднем $(27+18) : 2 = 23$ колонии. Таким образом в 1 мл водопроводной воды содержится 23 бактерии, что не превышает норму.
- Общее микробное число в 1 мл питьевой воды не должно превышать 50.

Определение общего микробного числа (ОМЧ) воздуха в лаборатории седиментационным методом и с помощью аппарата Кротова (1-й день исследования)

Для проведения санитарно-бактериологического исследования воздуха используют седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод Коха (Koch, 1881 г) основан на спонтанном оседании микроорганизмов под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри.

Для определения **общего микробного числа** две чашки Петри со стерильным МПА оставляют открытыми в течение 10-30 мин. Затем их закрывают, надписывают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 час.

Для выявления **санитарно-показательных микроорганизмов** используют специальные питательные среды: для стафилококков – желточно-солевой агар (экспозиция 15 мин), для гемолитических стафилококков и стрептококков – кровяной агар (экспозиция 10-15 мин), для грибов – среду Сабуро (посевы выдерживают 3-5- суток при 20-22 °С).

Аспирационный метод

- основан на ударном действии воздушной струи о поверхность питательной среды, на которую оседают микроорганизмы. Его проводят с использованием аппарата Кротова или его современных модификаций (ПУ-1Б и др.)



Определение общего микробного числа (ОМЧ) воздуха (2-й день исследования)

После инкубации подсчитывают суммарное количество колоний, выросших на чашках, и полученные данные пересчитывают на 1 м³ исследуемого воздуха.

Седиментационный метод:

исходят из того, что за 5 мин на поверхность 100см² плотной среды оседают бактерии из 10 литров воздуха.

Например, на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 55 колоний, на второй – 31, т.е. всего $55+31=86$ колоний. Чашки стояли открытыми 10 минут, значит, всего осело бактерий из 40 л воздуха. Таким образом в 40 л воздуха содержится 86 микробов. Общее микробное число в пересчете на 1 м³ воздуха составляет $86 : 40 \cdot 1000 = 2150$ бактерий.

Аспирационный метод:

Например, на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 246 колоний, на второй – 254, т.е. в среднем $246+254=250$ колоний. Аппарат вращал чашку Петри 2 мин со скоростью 25 л/мин. Всего было пропущено 50 л воздуха. Таким образом, в 50 л воздуха содержится 250 микробов, а общее микробное число в пересчете на 1 м³ воздуха составляет $(250 \cdot 1000) : 50 = 5000$ бактерий.

Изучение нормальной микрофлоры организма человека (1-й день исследования)

Смыв с кожи рук (отбор материала для исследования).

Увлажненный стерильной водой тампон дают в руки обследуемому, предлагая протереть им сначала кожу левой, а затем правой руки в такой последовательности (от участков с меньшей к участкам с большей загрязненностью): тыл кисти, ладонную поверхность, межпальцевые пространства, ногтевые ложа. По окончании процедуры тампон помещают в пробирку, в которой он находился.

Бактериологическое исследование смывов. К 2 мл воды, которая была использована для увлажнения тампона, прибавляют еще 8 мл воды. Тампон тщательно в течение 2-3 минут отмывают, получая исходное разведение. Из него готовят ряд последовательных десятикратных разведений. По 1 мл каждого разведения вносят в стерильные чашки Петри, заливают МПА. Посевы инкубируют 24 ч при температуре 37⁰.

Взятие слизистого отделяемого полости носа.

Тампон вводят в глубь полости носа и снимают слизь со стенки носовой перегородки. Забирать материал из разных ноздрей можно одним тампоном.

Материал засевают штрихом на кровяной агар и ЖСА. Посевы инкубируют 24 ч при температуре 37⁰.

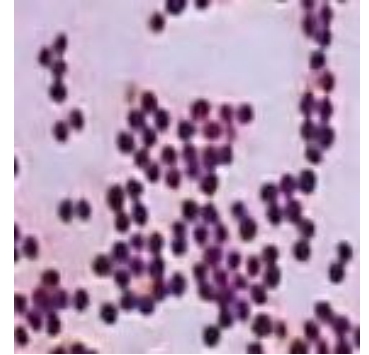
Изучение нормальной микрофлоры организма человека (2-й день исследования)

Изучены 2 вида колоний после посева мазка из носа на кровяной агар и ЖСА.

1. ЖСА: колонии мелкие, (1,0 – 3,0 мкм), край ровный, гладкие, кремового цвета. Среда вокруг колоний не изменена.

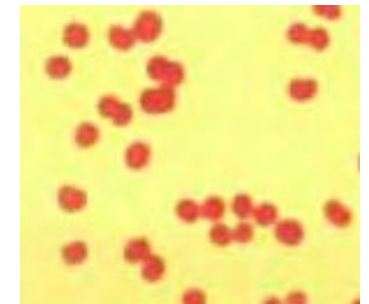
При окраске по Граму: Грам+ кокки, характерное расположение в виде виноградной грозди.

Предположительно: стафилококки. Культура требует дальнейшей идентификации.



2. Кровяной агар: колонии более крупные, 3-4 мм, гладкие, край ровный, бесцветные.

При окраске по Граму: Грам(-) кокковидные палочки. Культура требует дальнейшей идентификации.



Изучение нормальной микрофлоры организма человека (2-й день исследования)

Изучены 2 вида колоний после посева смыва с рук на кровяной агар.

1. Колонии мелкие (1,0 мм), окружены зоной гемолиза, гладкие, бесцветные край ровный.

При окраске по Граму: Грам+ кокки, характерное расположение в виде цепочек. Предположительно стрептококки. Культура требует дальнейшей идентификации.



2. Колонии выпуклые, мутные, ровные края, 3-4 мм, гладкие.

При окраске по Граму: Грам(-) палочки. Предположительно БГКП. Культура требует дальнейшей идентификации.

