



Микрофлора почвы, воды и воздуха

A close-up photograph of a small, vibrant green seedling with several leaves growing out of a patch of dry, cracked, brown soil. The soil is parched and fissured, creating a stark contrast with the fresh plant. The lighting is bright, highlighting the texture of the soil and the color of the leaves.

Почва

а

Почв

состоит из минеральных частиц, воздуха, воды, органического вещества почвы, корней растений и живых организмов. По массе и объему живые организмы составляют на сегодняшний день наименьшую часть почвы.

Состав почвы:

50% -минеральные частицы

25% -воздух

25% - вода

Органическое в-во-**0.5-5%** от массы твердой фракции по весу(искл.: торфяные почвы, где она намного выше).

Биота

- Микробиота - менее 0,2 мм и состоит из бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей и простейших.
- Мезобиота имеет размер от 0,2 до 10 мм и состоит из нематод, энхитреид, колеммбол или ногохвосток, клещей, коловраток и мелких насекомых (членистоногих).
- Макробиота размером более 10 мм состоят из земляных червей, моллюсков и крупных членистоногих.

Причины исследования

- Эпидемиологическое исследование
- Определение путей передачи заболеваний и резистентности их возбудителей
- Загрязнение почвенных вод, рек, озер и т.д.
- Определение санитарных условий ПОВЫ

Исследование почвенной микробиоты.

- Исследование микрофлоры почвы, воды и воздуха затруднено из-за присутствия многих разных видов микробов, которые могут нуждаться в совершенно разных условиях для их выделения и идентификации: температуры, дыхания, питания и т.д.
- Из-за этой проблемы в основном используются бактерии, показывающие санитарные условия окружающей среды.
- Показательные бактерии для почвы: *E.coli*, *Streptococcus feacalis*, *Clostridium perfringens*, бактерии рода *Proteus*.
- Кроме того, можно проверить особые патогенные бактерии, особенно по эпидемиологическим причинам: *Salmonellas*, *Shigellas*, *Clostridium botulinum* и *tetani* и т.д.

Получение образца

- Берем образец из области заражения и на расстоянии от области заражения
- Взять образец из 5 мест по типу конверта
- Образца должно быть не менее 300г для сохранения влаги во время транспортировки
- Транспортировка должна занимать не больше 24 часов при температуре +4-5 С
- В лаборатории почва в первую очередь должна быть очищена от корней, камней, листьев и т. п.

Получение образца

Следует выполнять в асептических условиях, стерильными инструментами

Несколько проб грунта соединяют в стерильных условиях и смешивают со стерильной водой в соотношении 10-1 (30г почвы с 270 мл воды)

Такие суспензии используют для приготовления других соотношений по методике исследования и приблизительного бактериального числа

Микробное

число

- Это общее число микроорганизмов в 1г.

ПОЧВЫ

- Чистая почва содержит не больше 1-1,5 млн. бактерий на 1г.
- Результаты должны быть соотнесены согласно типу почвы (различные типы почв содержат различное количество бактерий)
- Также имеют место сезонные изменения

Микробное число

- Часто разведения: 10^{-3} до 10^{-5}
- Необходимо использовать не менее 2 разведений
- Нужно смешивать растворы перед посевом
- Каждый раствор сеять не менее чем на 2 чашках Петри
- Берут 1 мл раствора, и помещают на чашку Петри
- Добавляют 7-10 мл кипяченой и охлажденной до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ МПА(мясо-пептонный агар)
- Смешайте МПА с раствором мягким раскачиванием чашки Петри
- Провести оценку о исследовании на чашке

Микробное число(пример)

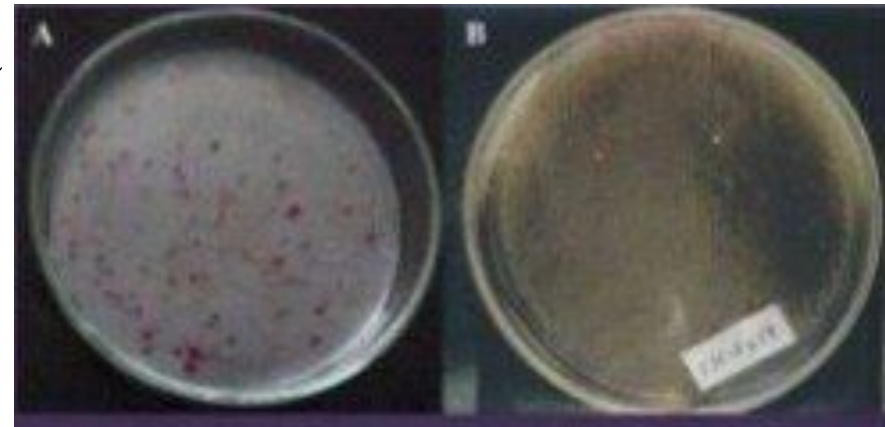
Название области	Количество колоний в разведении 1: 10000	Микробное число
1. Двор детского сада	70 =80 90	800 000

Коли-титр и коли-индекс

- **Коли-титр** - количество почвы, где присутствует 1 E.Coli
- **Коли-индекс** - количество E.Coli в 1 г почвы
- Для расчета коли-индекса на коли-титр: $1000 \text{ делений на коли-индекс}$

Метод титрования

- Смесь суспензии 1:10 с 50 мл жидких питательных сред
- Самый крупный лактозный бульон с 1,5 мл 2% -ного водного раствора ТТС (2,3,5-трифенил-2Н-тетразолийхлорид)
- *E.coli* может снизить ТТС до ТРФ (1,3,5 - трифенилфозмаза), что делает красно-коричневый цвет
- *E.coli* устойчив к ТРФ, которые нарушают рост других бактерий
- Инкубация в течение 24 часов при температуре 37
- При наличии газа, изменение цвета среды красно-коричневого цвета
посев на эндо-среде



Метод титрования



- В присутствии на эндо - средах розовых или красных колоний Гр- бактерий с отрицательной оксидазной активностью проводится их расчет и результаты интерпретируются в виде коли- титра среды до красно-коричневого цвета - посев на эндо-среду
- Для подтверждения повторов проводят посев колоний на полужидких средах с глюкозой и инкубацию его в течение 24 часов при температуре 37
- В присутствии в средах кислота и газ - результаты интерпретируются как положительные и подтвержденные

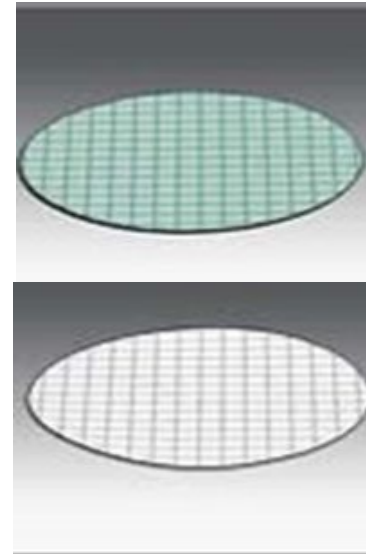
Метод титрования (другой вариант)

- Используется среда Кесслера (1% пептона, 5% желчи, 0,25% лактозы и горечавки - фиолетовый для ингибирования бактерий «Грамм +»)
- Инкубация в течение 24-48 часов при температуре 37
- В случае газообразования и непрозрачности - посев на эндо-средах с последующим исследованием, как в случае метода накладных расходов



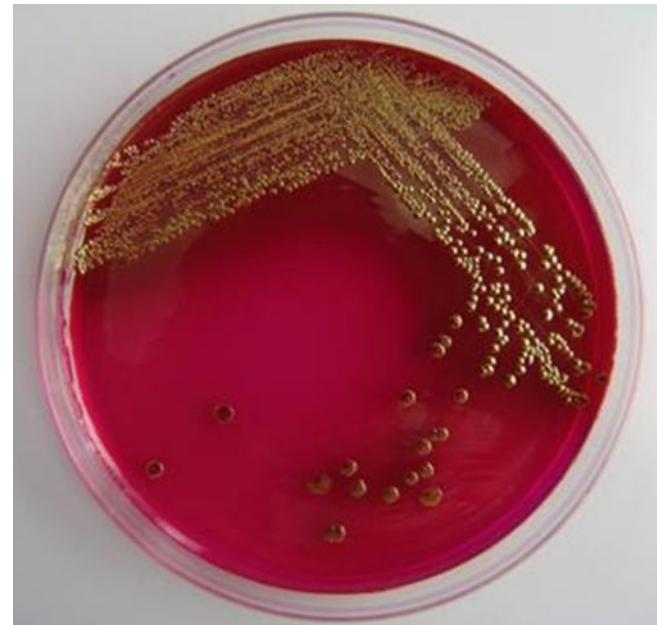
Способ мембранного фильтра

- Может уменьшить время анализа на 2 дня за исключением стадии культивирования на жидкой среде
- Для анализа почвы в небольших разведениях на мембранный фильтр может быть помещен планктонный фильтр
- Расчет производится на фильтрах с 30-50 колониями
- После этого выполняются расчеты по разведению и количеству колоний



Прямой поверхностный метод посева

- Используется для исследования «грязной» почвы
- Взвесь почвы при разведении 1:1 000 000 на среде Эндо и инкубация 24 часа при температуре 37°C
- Расчет розовых или красных колоний с металлическим блеском
- Для более четких результатов эти колонии подвергаются дальнейшей идентификации



Обнаружение *Clostridium perfringens*

- Почвенные растворы помещают по 1 мл в 2 ряда пробирок
- 1 ряд нагревают 15 мин при 80°C или 10 мин при 90°C
- Во все пробирки поместить по 10 мл кипяченой и охлажденной до 45°C среды Вильсон-Блера (Висмут Сульфит агар)
- Типичный состав (г/л): мясной экстракт 5.0; пептон из мяса 10.0; D(+)-глюкоза 5.0; динатрия гидрофосфат 4.0; железа(III) сульфат 0.3; бриллиантовый зеленый 0.025; индикатор сульфит висмута 8.0; агар-агар 15.0
- Распределение взвеси на среде и быстрое охлаждение в холодной воде для удаления воздуха

Обнаружение Клостридии перфингенс

- Инкубация около 2 часов при температуре 43 градуса
- В глубине агара появляются черные колонии, которые нарушают среду из-за газового образования
- В мазках должны быть обнаружены Гр+ бактерии
- Другой вариант: Использование средних SPN (сульфиты-полимиксин, неомицин средних) с инкубацией около 10-12 часов (температура-44-45 градусов)

Обнаружение Шигелл и Сальмонел

- Коактивация и центрифугирование по Фикеру
- Из 30-50 грамм почвы готовят разбавленный раствор 1:10 к стерильной воде
- Для концентрации бактерий в 500 мл из суспензии добавляют 2 мл 10%-ного раствора NaHCO_3 и после этого добавляют 1.7 мл 10%-ного раствора суспензии Fe_2SO_4
- Перемешивают суспензию и оставляют её на 1 час при $t=4\text{C}$
- Осажденные хлопья подвергают осаждению в течение 5 мин и титрованию с 25% винной кислоты до разбавления осаждения

Обнаружение Шигелл и Сальмонел

- Полученный раствор подвергают посеву на твердой среде (среда Уилсона Блера и среда Плоскирева)- 4 чашки
- Оставляют раствор с 50 мл 10-20%-ного желточного бульона с последующей инкубацией (5-6 часов при 37 гр.) и прививают в твердые избирательные среды
- После 8-20 часов –дополнительное повторное кормление
- Дальнейшая идентификация бактерий выполняемых в соответствии с классическими стадиями идентификации Шигелл и Сальмонел



Выявление столбнячной палочки (*Clostridium tetani*).

- Стерильными инструментами берем 20-30 г почвы, 3-5 г смешиваем с 10-15 мл 0,9% раствором хлорида натрия;
- Через 3-4 часа раствор следует вводить подкожно в правую заднюю конечность белых мышей (1 мл);
- Каждая проба исследуется у 2 мышей;
- Для контроля, мышам вводят в лоб инъекцию антитоксиновой сыворотки;
- Смерть подопытных животных с симптомами столбняка и выживаемость мышей в контрольной группе, подтверждает наличие столбнячной палочки в почве.



Выявление возбудителя ботулизма (*Clostridium botulinum*)

- (1 колба) 20-30 г почвы смешать в 80-100 мл среды Китта-Тароцци;
- (2 колба) В теплую колбу с 80°C в течение 30 мин для уничтожения неспорообразующих бактерий;
- Обе колбы инкубируют в течение 8-14 дней при температуре 37°C;
- Колонии высевали на сахарном агаре с дальнейшим исследованием в соответствии с биологическими и антигенными свойствами *Clostridium botulinum*.

Boð

a

Получение образцов

- Образцы из открытого водоема берут с глубины 10-15 см от поверхности, но не менее 10-15 см ото дна;
- Для этого используют **бутылку Нансена**;
- Водопроводную воду можно собирать в стерильную бутылку объемом 500мл, после 10 мин подачи воды и стерилизации конца трубопровода пламенем;
- К хлорированной воде необходимо добавить 2 мл 1,5% раствора тиосульфата натрия;
- Транспортировка образцов должна быть при температуре +4 -10 (6 часов) или 2 часа без охлаждения.



Причины проверки

- Санитарный контроль.
- По эпидемиологической причине для выявления патогенных кишечных бактерий (Сальмонелла ,Шигеллы и др),
Энтеровирусы...
- Обнаружение новых кишечных инфекций .
- Выбор источника воды .
- Проверка качества и уровня очистки сточных вод.

Микробное число

- Исследование полной дозы мезофильной аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в 1 мл воды, которые могут в течении 24 часов инкубироваться при температуре 37 С колонии в кучковой форме на МПА, которые могут быть видны глазами или увеличены в 2-5 раз .
- В зависимости от чистоты воды готовят разбавления от 1:10 для чистой воды, до 1:10 000 для очень грязных источников .
- Для исследования расходуется 1 мл, без разбавления .
- Семенной материал на отварном и охлажденном до 45С МПА или на солевом агаре для грибов.
- Инкубировать МПА в течении 24 ч(температура 37С) или солевой агар в течении 23 дн при температуре 27 С

Микробное число

- Расчет выполнен с увеличением по размерам не более 300 колоний .
Если больше – использовать другие разбавления .
- Микробное число водопроводной воды , должно быть не более 100 КОЕ(колониобразующие единицы) в 1 мл.

Обнаружение кишечной палочки(*E. coli*): двухфазный ферментативный тест

- Этот метод отличается от приведенного в книге !!!
- Соответствует Правительственному Стандарту 18963-73
- Объемы 3x3 по 10 мл, 1 мл и 0,1 мл - для 10 мл используют колбы с лактозо-пептонной средой, другие - пробирки с 5 мл питательной среды
- Для водопроводной воды – объемы 3x3 по 100 мл, 10 мл и 1 мл – для 100 мл используют концентрированную глюкозо-пептоновую среду, для 10 мл и 1 мл – разбавленную
- Культивируют в течение 24 часов, T - 38°C
- В случае отсутствия газообразования и осадков - результат отрицательный

Двухфазный ферментативный тест

- ❖ В случае наличия газообразования и осадения - материал сеют на среду Эндо для выделения колоний
- ❖ Если на среде Эндо наблюдается рост темно-красных колоний с металлическим блеском – проводят оксидазный тест
- ❖ Если присутствуют Грам "-" род бактерий без оксидазы - тест признается положительным и интерпретируется в коли-индекс (количество *E. coli* в 1 л воды) в соответствии с таблицей

Обнаружение нового фекального загрязнения

- Из 3 объемов лактозо-пептонной среды, где после инкубации было обнаружено образование газа, петли бактерии сеют на лактозную среду с борной кислотой
- Культивируют в течение 24 часов ($T = 43^{\circ}\text{C}$)
- Наличие газа и помутнение демонстрирует новые фекальные загрязнения
- Только помутнение - отрицательный результат

Метод мембранной фильтрации

- Фильтрация воды в объеме 100, 10 и 1 мл для чистой воды и 0,1;0,01 мл для грязной воды. Исследование начать с больших разведений
- Для заполнения объема 1 мл и менее первоначально смешайте его с 10 мл стерильной воды
- После фильтров фильтрации берутся стерильным пинцетом и помещают на среду Эндо (поверхность фильтрации на верхнем уровне): на 1 чашку – 3-4 мембранных фильтра
- Инкубация: 18-24 часа, $T=37^{\circ}\text{C}$
- Для расчета используются фильтры с числом колоний от 10 до 50
- Для расчета коли-индекс количество колоний умножают на 1000 и делят на объем исследуемой воды
- **Метод позволяет обнаружить больше бактерий, затем после него два этапа ферментативного теста!!!**

Обнаружение Энтерококков (*Streptococcus faecalis* и т. д.)

Индекс Энтерококков определяется с помощью выращивания их в жидких щелочных средах полимиксина с 10-кратным разведением в зависимости от чистоты воды (от 100 до 0,01 мл)

- 100 мл и 10 мл посев на двойной концентрации среды, остальные –обычные концентрации.
- Инкубация: 24 часа, T=37C
- Положительный результат – изменение цвета, прозрачности
- Для контроля из положительных колб и пробирок с бактериями посев производят на чашке с молочно-ингибиторной средой. *Streptococcus faecalis* здесь имеет вид черных колоний с металлическим блеском.

Обнаружение патогенных бактерий

1. Посев на Сальмонеллы первоначально делают на накопительных средах (среды, содержащие магний и селен). Дальнейшее исследование идет по классическому методу определения Сальмонелл.

2. Определение шигелл проводят на водопроводной воде в случаях аварии с канализацией. Для накопительных сред используют среды с суслон (400 мл воды смешать со 100 мл среды с суслон) После инкубации в течение 24 часов ($T=37^{\circ}C$) делают посев на среду Плоскирева или среду Левина с дальнейшей классической идентификацией.

A dramatic sky with a rainbow on the left side and large, white, fluffy clouds in the foreground. The background shows a hazy horizon over a body of water.

Возду

X

Причины исследования

- Определение бактериального загрязнения воздуха микробами из носоглотки человека
- Прямое исследование наличия патогенных и условно-патогенных бактерий как возбудителей внутрибольничных инфекций
- На заводах: исследование наличия в воздухе микробах, используемых для промышленных целей.

Метод Коха (метод седиментации)

- Установить открытые чашки Петри с МРА в комнате в течение 10 мин (для кокков-40 мин, специальная среда).
- Инкубация: 24 часа (Т-37 и 24 часа (комнатная температура).
- Рассчитать количество колоний, измерить диаметр чашки
- Для подсчета микробного числа количество бактерий в 1 м³ воздуха: количество колоний умножают на коэффициент

Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см ²	Коэффициент для экспозиции 10 минут
8	50	100
9	63	80
10	78	60

Метод Кротова (метод аспирации)

- Более чувствительный, потому что не зависит от воздушного потока в помещении.
- С помощью центробежного вентилятора воздух поглощается через щель и распространяется на вращающейся чашке Петри со средой. Скорость 20-25 м / мин. Время экспозиции-2 мин.
- Инкубация: 24 часа ($T=37\text{ C}$) и 24 часа. (ком. температура).
- Расчет количества бактерий:
количество колоний, умножают на 1000 и делят на объем поглощенного воздуха



38. Метод Кротова (метод аспирации)

1.Обнаружение Staphylococci

250 дм³ воздуха, поглощаемого аппаратом Кротова, на 203 чашках с агаром молочного желтка и кровяным агаром.

Инкубация: 37 ° С, 48 часов.

2. Обнаружение Streptococci

200-250 дм³ воздуха, поглощаемого аппаратом Кротова на 203 чашках с средой Гарро и кровяным агаром.

Инкубация: 37 ° С, 18-24 часа, затем 48 часов при комнатной температуре

obrigado

Dank U

Merci

mahalo

Köszí

спасибо

Grazie

Thank
you

mauruuru

Takk

Gracias

Dziękuję

Děkuju

danke

Kiitos