

## **Лекция. Методы санитарно-микробиологического исследования почвы и оценка ее качества по показателям СПМ. – 22 апреля.**

### **1. Санитарно-показательные микроорганизмы почвы.**

### **2. Нормативные документы, регламентирующие методы санитарно-микробиологического исследования почвы и критерии оценки ее качества по микробиологическим показателям.**

#### **1. Санитарно-показательные микроорганизмы (СПМ) почвы.**

К СПМ почвы относятся бактерии группы кишечной палочки (БГКП), энтерококки, термофилы, возбудители газовой гангрены.

Самым первым микроорганизмом, предложенным в качестве СПМ, была *Escherichia coli* (кишечная палочка). Она до сих пор сохраняет ведущие позиции как показатель фекального загрязнения. В последующем список СПМ расширялся, в него были включены фекальные стрептококки (энтерококки), споры сульфитредуцирующих клостридий, протей, термофильные микроорганизмы, колифаги (вирусы бактерий) и ряд других. Таким образом, обнаружение в почве СПМ (в качестве которых могут выступать и некоторые патогенные микроорганизмы) и установление их численности лежит в основе определения значения СП. СПМ постоянно обитают в естественных полостях человека и теплокровных животных. Они непрерывно выделяются во внешнюю среду в количествах, относительно редко подверженных колебаниям. Присутствие СПМ в исследуемой почве однозначно свидетельствует о наличии в ней выделений человека и/или животных; численность СПМ прямо пропорциональна степени биогенного загрязнения почвы.

Санитарное состояние почв населенных мест оценивается комплексно по санитарно-химическим, санитарно-бактериологическим, санитарно-паразитологическим, санитарно-энтомологическим показателям. Последние три группы показателей отражают степень биологического загрязнения почв.

Почва как неотъемлемый элемент агросферы и урбаносферы является главным резервуаром и биотопом санитарно-показательных микроорганизмов (СПМ); в чистой почве на территориях жилой застройки и детских учреждений не допускается наличие возбудителей каких-либо кишечных инфекций, патогенных бактерий и энтеровирусов; индекс СПМ для чистой почвы должен быть  $< 10$  КОЕ/г, титр  $\geq 1,0$  г.

#### **2. Нормативные документы, регламентирующие методы санитарно-микробиологического исследования почвы и критерии оценки ее качества по микробиологическим показателям.**

В ряде государственных природоохранных законов, других нормативных документах регламентированы требования к качеству почвы сельскохозяйственных угодий и населенных мест, показатели ее санитарно-

эпидемиологической оценки, содержатся общие рекомендации по рациональному использованию и охране почвенного покрова.

Главные государственные документы, регулирующие использование почв и земельных угодий, – это федеральные законы «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», «Об охране окружающей среды», Земельный кодекс РФ, а также свод санитарно-эпидемиологических правил и нормативов, посвященных гигиенической оценке почвы. Согласно закону «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» на территории РФ действуют нормативные документы, регулирующие в объектах экосферы предельное содержание санитарно значимых биоагентов и предельно допустимые концентрации вредных веществ. На основе этих двух важнейших групп показателей вредности (биобезопасности) официально оценивается санитарно-эпидемиологическое состояние почвы различных территориальных объектов.

#### Перечень нормативных документов:

1. СанПиН 2.1.7.1287-03. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы.
2. СП 1.2.1170-02. Гигиенические требования к безопасности агрохимикатов.
3. СанПиН 1739-77. Оценочные показатели санитарного состояния почвы населенных мест.
4. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.
5. Методы микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации № ФЦ/4022-2004.
6. Федеральный закон «Об охране окружающей среды» от 10 января 2002 г. (ст. 19).
7. МУ 2.1.7.730-99 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест».
8. МУ по санитарно-микробиологическому исследованию почвы №2293-81. Утв. МЗ СССР 19.02.81.

Требования к качеству почв населенных мест и сельскохозяйственных угодий при размещении, проектировании, строительстве, реконструкции и эксплуатации объектов различного назначения устанавливают санитарные правила СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы».

Санитарно-эпидемиологические требования предъявляются к жилым территориям, рекреационным и курортным зонам, территориям сельскохозяйственного назначения, зонам влияния автотранспорта, захороненных промышленных отходов (почва территорий, прилегающих к

полигонам) и других, где возможно влияние загрязненных почв на здоровье человека и условия проживания.

Экологический мониторинг предусматривает комплексные исследования почвы, а именно ее токсикологическую, радиологическую, паразитологическую и микробиологическую экспертизы. Основная задача микробиологической экспертизы - получение информации о заселении почвы биоагентами, как вредными, так и полезными для человека, домашних животных, культивируемых растений. Подобные сведения крайне важны для прогнозирования, профилактики, предотвращения и/или минимизации негативных последствий, а также для планирования комплекса долгосрочных мероприятий по ремедиации (восстановлению, «излечиванию») нарушенной или больной почвы. Микробное загрязнение почвы прямо и/или опосредовано (через воду, воздух, продукты питания) влияет на человека и условия его проживания. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы различных территорий изложены в ряде официальных документов (см. выше). В них регламентированы допустимые уровни содержания условно-патогенных микроорганизмов в почвах различного назначения, а также методики (протоколы) определения регламентированных санитарных показателей. При загрязнении почвы возбудителями особо опасных инфекций ремедиационные мероприятия в каждом конкретном случае разрабатываются в соответствии с действующими нормативными документами и согласовываются с региональными органами и учреждениями Госсанэпиднадзора. Именно эти учреждения осуществляют категоризацию почвы по ее санитарному состоянию и обладают правом выдавать санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии почвы обследуемого земельного участка действующим санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам (СанПиН). Общее содержание мероприятий по рекультивации и ремедиации почв селитебных территорий, угодий АПК, а также стандартный и расширенный перечни контролируемых биообъектов изложены в санитарных правилах. Почва как неотъемлемый элемент любого ландшафта была и остается главным резервуаром и биотопом санитарно-значимых микроорганизмов. Поэтому нормативные документы по ее санитарной оценке актуальны и продолжают оставаться действующими. Непрерывно выполняя уникальные социально-экономические и экологические функции, почва, тем не менее, сама нуждается в постоянной защите. Соблюдение санитарных нормативов применительно к почве - это, в конечном счете, обеспечение и сохранение благоприятной среды обитания сельских и городских социумов, гарантия их экологического благополучия. В соответствии с законодательством одной из важных задач нормирования в почве и других компонентах экосферы вредных биоагентов является регулирование их численности целенаправленными природоохранными и социально-экологическими мероприятиями. Однако исторически сложилось так, что нормирование параметров биоценозов почвы (как важнейшего компонента агроценоза) преимущественно фокусировалось на регулировании качества почвы сельскохозяйственных угодий. При этом решались две

важные задачи: получение экологичной агропродукции и обеспечение биобезопасности землепользователей и других работников, непосредственно контактирующих с почвой. В то же время, применительно к почвам урбаносферы, других селитебных, а также рекреационных территорий главная задача их санитарно-гигиенического мониторинга сводилась лишь к оценке их эпидемической безопасности – этой важнейшей составляющей биобезопасности социумов. Согласно методическим указаниям, гигиенические требования к качеству почвы селитебных и водоохраных территорий, в первую очередь, устанавливаются для наиболее значимых объектов - зон повышенного риска. В числе последних детские и образовательные учреждения, спортивные, игровые, детские площадки жилой застройки, площадки и места рекреации в зонах санитарной охраны водоемов, прибрежных и санитарно-защитных зон (табл. 2). По степени опасности для местного населения почва поселенческих территорий классифицируется как чистая, умеренно опасная, опасная и чрезвычайно опасная, либо как чистая, загрязненная и сильно загрязненная. Действующие гигиенические нормативы и санитарно-оценочные показатели загрязненности почвы вредными биоагентами изначально (в 1950–1970-е гг.) разрабатывались и научно обосновывались ведущими отечественными микробиологами и гигиенистами – Е.Н. Мишустиним, М.И. Перцовской, И.М. Перелыгиным, Е.И. Гончаруком, Д.Г. Звягинцевым и др. Общее санитарное состояние почвы с учетом характера микробного заселения принято оценивать сравнением его с действующими регламентными показателями. Сводка по Государственным нормативам, характеризующим эпидемическую опасность почв населенных пунктов, дана в Федеральном законе «Об охране окружающей среды» от 10 января 2002 г. (ст. 19).

**Санитарно–бактериологическое исследование почвы** включает *определение микробного числа и содержания санитарно-показательных микроорганизмов* почвы.

Гигиеническая оценка почвы населенных мест проводится согласно инструкции 2.1.7. 11-12-5-2004.

Оценка санитарного состояния почвы проводится по результатам анализов почв на объектах повышенного риска (детские сады, игровые площадки, зоны санитарной охраны) и в санитарно-защитных зонах по следующим показателям - санитарно-показательные микроорганизмы бактерий группы кишечной палочки (БГКП) - общие колиформные бактерии, фекальные энтерококки. На свежее фекальное загрязнение почвы указывает наличие высокого индекса БГКП при низких титрах нитрофикаторов, термофилов и высоком содержании вегетативных форм *Clostridium perfringens*. Обнаружение энтерококков свидетельствует о свежем фекальном загрязнении.

Обнаружение возбудителей кишечных инфекций, патогенных энтеробактерий и энтеровирусов свидетельствует об эпидемической опасности почвы.

Почву оценивают как чистую при отсутствии патогенных бактерий и индексе санитарно-показательных микроорганизмов до 10 клеток на 1 г почвы. При загрязнении почвы сальмонеллами индекс санитарно-показательных микроорганизмов БГКП и энтерококков достигает 10 клеток на 1 г почвы и более. Концентрация колифага в почве на уровне 10 БОЕ/г свидетельствует о загрязнении почвы.

Отбор проб для бактериологического анализа проводится не реже 1 раза в год в местах возможного нахождения людей, животных, в местах загрязнения органическими отходами. Образец почвы тщательно перемешивают, из него отбирают навески, величины которых выбирают исходя из предполагаемой степени загрязнения почвы и планируемых определений. Для учета почвенных микроорганизмов достаточно навески от 1 до 10 г. Первое разведение навески почвы (1:10) делают в стерильной посуде на стерильной водопроводной воде. После приготовления разведений применяют соответствующую обработку почвы с целью извлечения клеток микроорганизмов из почвенных агрегатов при помощи 10-минутного вертикального встряхивания почвенной суспензии первого разведения в пробирках с резиновыми пробками. Почву разводят до 0,0001-0,00001 г/мл. приготовленные разведения используют для посева на различные питательные среды.

**Микробное число почвы** - это общее количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы.

По микробному числу почвы судят об общей численности в основном сапрофитных микроорганизмов, вырастающих на МПА и сусло-агаре; если же необходимо выделить определенные группы микроорганизмов (например, азотфиксирующие, разлагающие клетчатку, продуцирующие антибиотики, нитрифицирующие, некоторые патогенные и т.д.), используют специальные среды и методы посева.

Для определения **коли-титра почвы** используют элективные питательные среды, содержащие желчь и генциановый фиолетовый, подавляющие рост многочисленных микроорганизмов, населяющих почву, но не препятствующие росту кишечной палочки. Наиболее употребительной является жидкая среда Кесслера, которая, кроме вышеназванных компонентов, содержит пептон и лактозу, сбраживаемую *E.coli*, для улавливания образовавшегося газа служат поплавки. После суточной инкубации посевов разведений почвы на среде Кесслера отбирают положительные пробы, в которых наблюдается обильное газообразование и диффузный рост, эти признаки характерны для развития *E.coli*, ферментирующей лактозу с образованием газа, скапливающегося в поплавке. Из отобранных посевов делают высевы на среду Эндо, инкубируют при 37°C 24 ч, отмечают характерные для *E.coli* темно-красные колонии с металлическим блеском, производят микроскопию и при наличии в мазках мелких грамтрицательных палочек делают вывод о присутствии *E.coli*.

**Перфрингенс-титр почвы** - наименьшее ее количество, выраженное в граммах, в котором содержится одна жизнеспособная клетка *S.perfringens*.

Для определения *C.perfringens* в почве используют железо-сульфитный агар (среду Вильсона-Блера). Перфрингенс-титр определяется максимальным разведением почвенной суспензии, при посеве которого развиваются характерные черные колонии. В некоторых случаях, кроме среды Вильсона-Блера, используют молочные среды (среду Тукаева). На этой среде *C.perfringens* энергично сбраживает лактозу, молоко быстро (в течение 3-4 ч) створаживается, образующийся газ разрывает сгустки казеина и вытесняет их в верхнюю часть пробирки. Наличие *C.perfringens* на средах Вильсона-Блера и Тукаева подтверждается микроскопически. В мазках, окрашенных по Граму, бактерии имеют вид крупных грамположительных палочек с прямыми концами, которые могут располагаться цепочками.

Присутствие в почве *E.coli* и *Enterococcus faecalis* указывает на свежее фекальное загрязнение; бактерии родов *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Clostridium perfringens* - на давнее фекальное загрязнение. Высокая численность сапрофитной микрофлоры свидетельствует об органическом загрязнении.

**Определение общих колиформных бактерий (ОКБ).** При анализе почв, для которых предполагается невысокая степень фекального загрязнения, рекомендуется использовать титрационный метод. В качестве ускоренного метода для анализа слабозагрязненных почв можно использовать метод мембранной фильтрации. При анализах проб с предполагаемой высокой степенью фекального загрязнения целесообразно проводить прямой посев разведения суспензии на поверхность среды Эндо. **Титрационный метод.** Из первого разведения почвенной суспензии (1:10), прошедшей предварительную обработку, стерильной пипеткой берут 10 мл, что соответствует 1 г почвы, и засевают во флаконы с 50 мл жидкой лактозо-пептонной среды или среды Кесслера. Посев меньших количеств (0,01 г; 0,001 г и т.д.) делают по 1 мл из соответствующих разведений почвенной суспензии в пробирки с 9 мл той же среды. Посевы инкубируют в течение 48 ч при  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Через  $24\pm 2$  ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. При отсутствии газообразования и помутнения через 48 ч инкубации выдают отрицательный ответ.

При наличии в посевах признаков роста (помутнения и газообразования или только помутнения) производят высев на среду Эндо и инкубируют в течение 18-24 ч при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . При наличии роста на поверхности среды Эндо розовых или красных колоний, малиновых с металлическим блеском или без него проводят микроскопию колоний с последующей постановкой оксидазного теста.

**Метод мембранной фильтрации.** Метод основан на фильтрации установленного объема - 5-10 мл почвенной суспензии первого разведения (1:10). Метод фильтрации почвы через мембранные фильтры проводится так же, как и фильтрация воды. После окончания фильтрования фильтр переносят, не переворачивая его, на питательную среду Эндо с добавлением розоловой кислоты. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной пробы, номера и даты посева. Чашки с

фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посеvy при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение  $24\pm 2$  ч.

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобною типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитывают число колоний каждого типа отдельно и подтверждают их принадлежность к ОКБ (наличие оксидазной активности, отношение к окраске по Граму, ферментация лактозы до кислоты и газа).

**Прямой поверхностный посев на агаризованные питательные среды.** Посев почвенной суспензии в количестве 0,1 или 0,2 мл производят на поверхность среды Эндо шпателем. Посев при анализе сравнительно чистых почв производят из разведений от 1:10 до 1:1000, т.е. 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 течении 24 ч и проводят идентификацию выросших микроорганизмов аналогично тому, как изложено при описании титрационного метода и подсчета количества колиформных бактерий в 1 г почвы. Для этого среднее число колиформных колоний, выросших на чашке, умножают на степень десятикратного разведения. Результат выражают индексом.

**Определение энтерококков.** Энтерококки - грамположительные, не образующие каталазу кокки, слегка вытянутые, с заостренными концами, располагающиеся попарно или в виде коротких цепочек, реже одиночными кокками, полиморфны, при росте на жидких средах (лактозопептонная среда) и щелочная энтерококковая среда вызывают диффузное помутнение и образование осадка. Энтерококки определяют титрационным методом и методом мембранной фильтрации.

**Титрационный метод.** Из разведений почвенной суспензии, прошедшей предварительную обработку, стерильной пипеткой берут 10 мл и засевают во флаконы с 50 мл жидкой среды ЛПС или ЩЭС. Посевы инкубируют при температуре  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  24 ч. Из среды накопления, где отмечены признаки роста, производят высев петлей на одну из плотных питательных сред МИС, ЖСТ. Через 24-48 ч инкубации посевов при температуре  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  на молочно-ингибиторной среде отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых, с металлическим блеском (*E.faecalis*) или сероватых мелких, плоских колоний (*E.faecium*). Подтверждают принадлежность колоний к энтерококкам с помощью микроскопирования окрашенных по Граму мазков и постановкой каталазного теста.

**Метод мембранных фильтров.** Объем испытуемой пробы для посева выбирают с таким расчетом, чтобы не менее чем на двух фильтрах выросли изолированные колонии в количестве от 5 до 50. Через мембранные фильтры профильтровывают два-три 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 ч.

На среде ЖСТ через 24-28 ч колонии энтерококков плоские крупные с ровными краями, белые или бледно-окрашенные с небольшим кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Последние образованы *E.faecalis*.

На азидной среде - колонии энтерококков выпуклые с ровными краями, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным нечетко оформленным центром.

Все колонии, которые растут на азидной среде, можно отнести к фекальным энтерококкам, имеющим индикаторное значение.

При обнаружении в мазках энтерококков подсчитывают число колоний на фильтрах, суммируют и делят на объем профильтрованной воды.

**Определение колифагов.** Для выявления колифагов исходную почвенную суспензию интенсивно встряхивают 10-15 мин на аппарате для встряхивания жидкости или вручную, центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин. Далее берут 10 мл надосадочной жидкости, устанавливают рН 7,0, добавляют 1 мл хлороформа для освобождения воды от сопутствующей бактериальной флоры, интенсивно встряхивают и оставляют на 15 мин для осаждения хлороформа. Обработанную исходную пробу почвы или другие последующие разведения засевают по 1 мл на поверхность двух чашек с 1,5% МПА (рецепт 93) и сверху наслаивают 3 мл расплавленного и остуженного до 45<sup>0</sup>С 1,5% МПА, содержащего 0,2 мл суточной или 0,4 мл 4-часовой бульонной культуры *E.coli K12 Str<sup>R</sup>*. Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий *E.coli K12 Sti<sup>R</sup>* (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) вносят в чашку Петри и заливают 1,5% питательным агаром. После застывания чашки в перевернутом виде помещают в термостат на 18-24 ч при температуре 37±0,1<sup>0</sup>С. Через 18-24 ч просматривают посеы в проходящем свете. Проба считается положительной при наличии полного лизиса, просветления нескольких блюшек или одной блюшки на чашке с пробой почвы при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

Учет результатов. Подсчитывают число БОЕ на двух чашках, делят на 2 и умножают на степень разведения. Результат выражают количеством БОЕ в 1 г почвы.

**Определение *C.perfringens* в почве.** По 1 мл разведении почвы (до 1:10<sup>6</sup>), прогретой при температуре 75±5<sup>0</sup>С в течение 20 мин для исключения вегетативным форм, вносят в два параллельных ряда пробирок. Затем по стенке пробирок, избегая образования пузырьков воздуха, наливают по 9-10 мл железосульфитный агар, приготовленный *ex tempore* и прогретый до 70-80<sup>0</sup>С. Для создания анаэробных условий роста пробирки быстро охлаждают, помещая в емкости с холодной водой. Посевы инкубируют при 44±1<sup>0</sup>С в течение 16-18 ч. При росте в среде черных крупных колоний (грамположительные, каталазоотрицательные) выдают положительный ответ о присутствии *C.perfringens* в 1 г почвы.

Определение *C.perfringens* методом фильтрования в пробирках и в чашках Петри проводят аналогично исследованию питьевой воды.

**Определение общей численности почвенных микроорганизмов (ОМЧ).** Навеску почвы, используемой для приготовления первого



разведения, доводят путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния, растирают в течение 5 мин. Затем готовят первое разведение (1:10), т.е.  $10^1$  почвы на стерильной водопроводной воде, после чего производят разведение суспензии обычным способом. Из каждого разведения делают посев не менее двух объемов по 0,1 или 0,2 мл на поверхность почвенного агара, разлитого в стерильные чашки Петри, и равномерно шпателем растирают посев по всей поверхности чашки. Термостатирование засеянных чашек ведут при 28-30°C в течение 72 ч. При учете результатов количество колоний на обеих чашках подсчитывают и суммируют, делят на два и умножают на степень разведения.