

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3

ЧАСТЬ 1 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И РАСТВОРА ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЙ

Цель работы: научиться готовить питательную среду и раствор для разведений микроорганизмов

1.1 Приготовление питательной среды «ГРМ-агар»

Питательную среду ГРМ-агар готовят согласно инструкции. Навеску 7,7 г сухого препарата питательной среды ГРМ-агар заливают 200 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают, кипятят в течение 2 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы или колбы, заполняя их не более чем на $\frac{3}{4}$, закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками, и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Среду охлаждают до температуры 45-50 °С, разливают в 3 стерильные чашки Петри слоем 4-6 мм (примерно 15-20 мл). Эти чашки будут использоваться для поверхностного посева. Оставшуюся среду оставляют во флаконе для глубинного посева в чашках. После застывания среды в чашках, их подсушивают, соблюдая правила асептики. Готовую среду можно использовать в течение 1 месяца при условии хранения ее при температуре 2-8 °С.

1.2 Приготовление изотонического раствора NaCl 0,9%

Навеску 1,8 г NaCl засыпать мерную в колбу на 250 мл, растворить в небольшом количестве воды, и довести водой до 200 мл. Полученный раствор перелить в посуду для автоклавирования (флакон или колбу), заполняя не более чем на $\frac{3}{4}$, закрыть ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками и стерилизовать автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Раствор охладить и разлить в 4 стерильных пробирки в количестве по 5 мл. Пробирки закрыть стерильными ватно-марлевыми пробками или фольгой.

ЧАСТЬ 2 ПОСЕВЫ ИЗ ВОЗДУХА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ПОМЕЩЕНИЙ

Цель работы: изучить седиментационный метод определения микробной контаминации воздуха.

Воздух является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов, так как в воздухе очень мало органических веществ и влаги. Микрофлора воздуха не постоянна. Микроорганизмы попадают в воздух из почвы, воды, с поверхности растений и т. п. С выделениями больных людей в воздух попадают патогенные микроорганизмы и возможно распространение возбудителей инфекционных заболеваний. Воздух может быть источником контаминации микроорганизмами товаров. Санитарное состояние воздуха жилых и производственных помещений оценивают по микробиологическим показателям: общему содержанию микроорганизмов и присутствию отдельных групп микроорганизмов. Наиболее простой способ определения контаминации воздуха микроорганизмами - седиментационный (чашечный) метод. Для исследования воздуха проводят экспозицию открытой чашки Петри с застывшей плотной питательной средой, инкубируют посевы, подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 м^3 воздуха, пользуясь формулой Омелянского.

Методика определения:

1. Проводят экспозицию открытых чашек Петри со стерильной плотной питательной средой в исследуемом помещении. Через 5 минут чашки Петри закрывают, переворачивают, помещают в термостат на 30 °С на 72ч (для роста бактерий) и на 24 °С на 5 суток (для роста грибов).
2. После культивирования микроорганизмов подсчитывают количество выросших колоний на чашках, суммируют и пересчитывают на 1 м^3 воздуха, пользуясь формулой Омелянского. Согласно приблизительным подсчетам Омелянского В.Л. на площади в 100 см^2 оседает в течение

5 мин. столько микроорганизмов и спор, сколько их содержится в 10 л воздуха. Следовательно, по пропорции можем рассчитать общее количество микроорганизмов в 10 л воздуха:

$$A = N \cdot S / 100$$

где A – количество микроорганизмов в 10 л воздуха, N – общее количество колоний микроорганизмов, выросших на всей чашки Петри, S – площадь чашки Петри, см^2 . Для пересчета числа микроорганизмов в 1 л воздуха воспользуйтесь данными таблицы 1.

Таблица 1 – Пересчет количества микроорганизмов в 1 м^3 воздуха согласно формуле Омелянского

Диаметр чашки Петри, см	Площадь чашки Петри, см^2	Множитель для расчета количества микроорганизмов в 1 м^3 воздуха
8	50	100
9	63	80
10	78	60
11	95	50
12	113	45

Пример расчета: на чашке Петри с диаметром 9 см (соответственно площадью 63 см^2) выросло 25 колоний. Количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха будет равно $25 \times 80 = 2000\text{ КОЕ/м}^3$.

В таблице 2 приведены нормативы оценки микробиологической чистоты воздуха закрытых помещений (КОЕ/м^3) в разное время года.

Таблица 2 – Нормативы оценки микробиологической чистоты воздуха закрытых помещений (КОЕ/м^3) в разное время года

Оценка воздуха		Количество микроорганизмов в 1 м^3	
		норматив	Результат
Лето	чистый	До 1500	
	загрязненный	До 2500	
Зима	чистый	До 4500	
	загрязненный	До 7000	

Задание: определить контаминацию воздуха по результатам посева. Подсчитать количество колоний на представленных образцах чашек Петри, рассчитать количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха, заполнить таблицу 3. Сравнить полученные результаты с нормативами оценки (таблица 2), сделать вывод о чистоте воздуха исследованного помещения. В случае превышения нормативных показателей дайте рекомендации по снижению уровня загрязненности воздуха в помещениях

Таблица 3 – Образец оформления результатов исследования посевов методом седиментации

№ пробы	Дата посева	Наименование помещения	Результат исследования, КОЕ/м^3	Норматив, КОЕ/м^3	Вывод

Часть 3 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И РУК

Санитарно-микробиологическое исследование предметов обихода, оборудования, мелкого инвентаря в торговых помещениях и на предприятиях проводится при проведении контроля за общим гигиеническим состоянием и определения общей контаминации и контаминации патогенными микроорганизмами объектов окружающей среды как возможных факторов передачи возбудителей заболеваний.

Биологическая контаминация объектов окружающей среды происходит постоянно. Главным источником микробного загрязнения является человек: выделения верхних дыхательных путей, отслаивающийся эпидермис, волосы, содержащие различные микроорганизмы - сапрофиты, условнопатогенные и патогенные. Загрязнение патогенными микроорганизмами различных объектов: мелкого торгового инвентаря, санитарной одежды, оборудования, посуды и др., - особенно обильно происходит при контакте с больными людьми и бактерионосителями. Контаминированные объекты служат пассивными посредниками при передаче опасных микроорганизмов здоровым людям. В основном это возбудители кишечных заболеваний и капельных инфекций (например, грипп). Возможность заражения человека зависит от многих факторов: концентрация микроорганизмов, их вирулентность, сроки выживания микроорганизмов на объектах окружающей среды, состояние макроорганизма. Часть микроорганизмов погибает в первые часы пребывания на объектах окружающей среды, но многие выживают, особенно при попадании в благоприятную среду, где они меньше подвергаются высыханию и инсоляции.

Цель работы: изучить метод определения общей микробной обсемененности предметов окружающей среды и рук

Методика исследования:

Определение общей микробной обсемененности основано на подсчете колоний, видимых при увеличении в 2 раза, выросших на питательных средах при инкубации посевов при 30 °С в течение 72 ч.

В стерильной пробирке с 5 см³ изотонического раствора хлорида натрия смачивают стерильный тампон, наклоня пробирку, тампоном производят смыв с исследуемой поверхности.

Тампон тщательно отмывают в том же растворе в пробирке, после чего с помощью дозатора по 1 см³ смывной жидкости вносят в две параллельные чашки Петри, заливают расплавленной и остуженной до 45 °С средой ГРМ-агар (15–20 см³), закрывают чашку крышкой, размешивают содержимое чашки круговыми движениями. Оставляют на 15-20 минут для застывания среды. После застывания агара чашки переворачивают и помещают в термостат при температуре 30 °С на 72 ч.

Предварительный учет колоний проводится через 48 ч, окончательный через 72 ч. Подсчитывают среднее арифметическое количество колоний, выросших на двух чашках, и умножают на 10 для определения количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемого предмета;

Если при посевах оказалось, что на засеянных чашках выросло менее 15 колоний, в заключении о результатах анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве (указать количество засеянной смывной жидкости)». При отсутствии роста колоний результаты выражают таким образом: «Не обнаружено микроорганизмов в 1 см³ смывов». Если на чашках, более чем на 1/2 их площади, имеется рост спорообразующих микроорганизмов или за счет спорных микроорганизмов подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов». Результаты выражают в колониеобразующих единицах — КОЕ (на 1 см² смывов).

Задание:

Провести смывы следующих вариантов:

- поверхность стола, не обработанного дезинфицирующим раствором (площадь 100 см²)
- поверхность стола, обработанного дезинфицирующим раствором, например 70% этанолом (площадь 100 см²)
- поверхность грязных рук
- поверхность рук, вымытых с мылом и обработанных 70% этанолом

При проведении смывов с плоских поверхностей желательно использовать шаблон, для того чтобы делать смыв с точно определенной площади поверхности. Металлический шаблон фламбируют перед использованием.

Для проведения смывов с рук их протирают тампоном, начиная с менее загрязненных участков: тыльную часть ладони, ладонь, межпальцевые поверхности, ногтевые ложа и подноготное пространство.

Результаты оформить в виде таблицы, сделать выводы о степени микробной обсемененности предметов и рук.

Таблица 4 - Образец оформления результатов исследования смывов с объектов окружающей среды и рук

№ пробы	Дата проведения анализа	Объект исследования	Использование дезинфекции (да/нет), если да – то какой	КОЕ/см ² смывов	Заключение о результатах анализа

В заключении сделать вывод о и влиянии обработки дезинфицирующим раствором на микробную обсемененность объектов.

Требования к оформлению отчета:

Отчет по лабораторной работе должен включать:

- 1) Название работы
- 2) Цели работы;
- 3) Краткое описание хода выполнения работы, расчеты, результаты, представленные в форме таблиц, рисунков/фотографий).
- 4) Выводы по каждой части работы.

Вопросы для самоконтроля:

1. Почему воздух является неблагоприятной средой для развития микроорганизмов?
2. Откуда микроорганизмы попадают в воздух?
3. В чем суть седиментационного метода определения контаминации воздуха?
4. В чем суть расчета по Омелянскому?
5. Что такое санитарно-микробиологическое состояние объектов окружающей среды?
6. Как попадают патогенные микроорганизмы в окружающую среду?
7. Размножаются ли патогенные микроорганизмы на предметах окружающей среды?
8. Как долго сохраняют жизнеспособность патогенные микроорганизмы на предметах окружающей среды?
9. Что такое КОЕ?