

## EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL SOLULUI

### 58.1. DATE GENERALE

Analiza microbiologică sanitară a solului ne permite să-i apreciem starea sanitaro-epidemiologică, pentru a elabora măsuri igienice orientate spre ocrotirea sănătății populației. Examenul microbiologic al solului are ca obiective:

- alegerea terenurilor pentru construcția locuințelor, a instituțiilor de copii (creșe, grădinițe, școli, tabere de odihnă);
- rezolvarea problemei de aprovizionare cu apă și canalizare a localităților;
- controlul capacității de autoepurare a solului;
- precizări privind implicarea posibilă a solului în transmiterea unor boli infecțioase;
- determinarea duratei de supraviețuire a microorganismelor patogene în sol;
- aprecierea sanitară a plajelor și locurilor de odihnă colectivă;
- supravegherea grădinilor de zarzavaturi irigate cu ape impurificate de suprafață.

Analiza microbiologică sanitară a solului se face curent sau preventiv.

Controlul sanitar curent include următorii *indicatori microbiologici minimali*:

- a) determinarea coliformilor;
- b) determinarea numărului total de bacterii;
- c) titrul *C.perfringens*;
- d) bacteriile termofile;
- e) bacteriile nitrificante (tabelul 58.1).

Tabelul 58.1. Calitatea solului în raport cu principalii indicatori bacteriologici

Solul	Titrul		NTM	Microorganisme termofile/g
	coliformilor	perfringens		
Curat	>10	>0,01	<10 000	100—1000
Poluat	0,9—0,01	0,009—0,0001	100 000 — 1 000 000	1000 —100 000
Masiv poluat	<0,009	<0,00009	1 000 000	100 000— 4 000 000

Controlul sanitar preventiv presupune o analiză completă care include:

- a) toate testele minimale curente;

- b) numărul și procentul sporilor;
- c) cantitatea actinomicetelor și fungilor;
- d) microorganismele capabile să descompună celuloza;
- e) microorganismele de amonificare;
- f) toxicitatea solului pentru microorganisme.

La indicații epidemiologice se determină prezența microorganismelor patogene: salmonele și shigele, bacili tetanic, botulinic și al antraxului.

## 58.2. EFECTUAREA ANALIZEI

### 58.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor

Recoltarea corectă a probelor impune descrierea localității cu precizări privind: caracterul reliefului, vegetația, climatul, dimensiunile teritoriului examinat, informații despre prezența sau lipsa canalizării, distanța de la sursele de impurificare. Pe arii de până la 1000 m<sup>2</sup> se selectează două sectoare cu suprafața de 25 m<sup>2</sup>: unul mai aproape de sursa de impurificare, iar altul (de control) la o anumită depărtare.

Recoltarea solului se face cu linguri sau spatule metalice sterilizate. Din profunzimea solului se recoltează probe cu ajutorul unor dispozitive speciale. Probele de 200—300 g se introduc în borcane de sticlă cu dop șlefuit sau în pungi de polietilenă neutră. Probele de sol recoltate din 5 puncte amplasate pe diagonala sectorului sau în colțuri și centrul lui (regula plicului), se amestecă într-un vas steril, pentru a obține o probă medie de cel puțin 1 kg. Proba, însoțită de o fișă în care este indicată data, ora și locul recoltării, trebuie transportată imediat la laborator și conservată la +4°C. Însămânțarea, în aceste condiții, se poate temporiza cel mult 24 ore.

### 58.2.2. Pregătirea probei pentru analiză

Din proba de sol se îndepărtează corpii de dimensiuni mari ca pietriclele, rădăcini, bucăți de sticlă, frunze ș.a. După fărâmițarea și omogenizarea probei într-un mojar steril, se cântăresc 30 g, care se introduc într-un balon cu dop șlefuit, ce conține perle de sticlă și 270 ml apă de robinet sterilă. Prin agitare îngrijită, timp de 10 minute, se obține diluția inițială 10<sup>-1</sup>, din care se pregătesc apoi diluții succesive decimale. Din diluția 10<sup>-1</sup>, cu o pipetă sterilă, se transferă 1 ml într-o eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă (diluția 10<sup>-2</sup>), apoi cu altă pipetă sterilă se transferă 1 ml din diluția 10<sup>-2</sup> în altă eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă (diluția 10<sup>-3</sup>) etc. Când se analizează un sol curat sunt suficiente diluții până la 10<sup>-3</sup> — 10<sup>-4</sup>, însă pentru solul impurificat sunt necesare diluții până la cel puțin 10<sup>-6</sup>.

### 58.2.3. Determinarea numărului total de bacterii

Se însămânțează câte 1 ml din fiecare diluție, bine omogenizată, paralel în două cutii Petri, în care se toarnă imediat câte 7—10 ml geloză topită și răcită la 45°C. Se amestecă bine geloză cu suspensia de sol prin rotații și, după solidificare, incubăm plăcile 24 ore la 28—30°C. Pentru numărare se aleg diluțiile din care au crescut 50—150 colonii/placă. Dacă au crescut mai mult de 150 colonii, se numără coloniile de pe 1/4 din suprafața plăcii

cu recalcularea pentru toată suprafața. Se determină media aritmetică a coloniilor dezvoltate pe cele două plăci, apoi se calculează numărul coloniilor ce revin la 1 g sol luând în considerație diluția.

Importanța sanitară a numărului total de germeni saprofiți trebuie apreciată numai în coroborare cu alți indicatori microbiologici și cu particularitățile solului examinat.

#### 58.2.4. Determinarea coliformilor

Pentru determinarea poluării fecale a solului se utilizează diferite metode de detectare a coliformilor: de titrare, metoda membranelor filtrante sau însămânțarea directă.

■ *Metoda de titrare.* Din diluțiile pregătite se însămânțează flacoane și eprubete cu mediul Kessler. Din diluția  $10^{-1}$  se însămânțează, cu o pipetă sterilă, 10 ml într-un flacon cu 50 ml mediu, ceea ce corespunde la 1 g sol. Din restul diluțiilor se însămânțează câte 1 ml în eprubete cu 9 ml mediu. Se termostatează însămânțările 48 ore la  $37^{\circ}\text{C}$ . Dacă în mediile însămânțate nu se observă turbiditate și producerea gazului, se formulează un răspuns negativ. Dacă apare turbiditatea mediilor sau turbiditate și gaz, atunci se fac repicări pe plăci cu mediul Endo sau cu geloză rozolică (geloză nutritivă cu bilă, lactoză, acid rozolic, albastru de bromtimol), cu incubare 24 ore la  $37^{\circ}\text{C}$ . Lipsa creșterii pe mediile de repicare permite formularea unui răspuns negativ. Dacă cresc colonii tipice pentru coliformi (roșii sau roz cu luciu metalic pe mediul Endo, galbene sau oranj pe mediul rozolic), se verifică microscopic pe frotiuri colorate Gram, se controlează activitatea oxidazică, apoi, pentru confirmare, se însămânțează pe mediul semilichid glucozat cu incubare 24 ore la  $37^{\circ}\text{C}$ . Apariția acidului și gazului confirmă prezența coliformilor. Rezultatul se exprimă în indice coli, adică numărul coliformilor ce revin la 1 g de sol.

■ *Metoda membranelor filtrante.* Este o metodă rapidă utilizată frecvent în cazul analizei unui sol mai puțin poluat. Se centrifugează diluția  $10^{-1}$  a suspensiei de sol timp de 5 minute la 2000 rpm pentru sedimentarea particulelor mai mari. Apoi se filtrează 5—10 ml din supernatant prin membrane filtrante N3. Analiza ulterioară se efectuează identic cu analiza apei, pentru a calcula numărul de colonii la 1 g sol.

■ *Insămânțarea directă.* Din solul locurilor cu impurificare fecală masivă se însămânțează câte 0,1 ml din diluțiile de la  $10^{-1}$  până la  $10^{-6}$  pe plăci cu mediul Endo. După incubare 24 ore la  $37^{\circ}\text{C}$ , se numără coloniile tipice pentru coliformi. Identificarea se efectuează prin testele uzuale. Rezultatele le exprimăm în titrul coli sau indicele coli.

#### 58.2.5. Determinarea *C.perfringens*

Depistarea în sol a *C.perfringens* indică o impurificare fecală și, indirect, prezența în sol și a unor clostridii patogene cum sunt: *C.tetani*, *C.botulinum*, care ajung în sol de asemenea cu materiile fecale ale omului și animalelor. Decelarea germeilor sulfitoreducător se poate efectua prin diferite metode.

■ *În mediul Wilson-Blair.* Din diluțiile de sol de la  $10^{-1}$  până la  $10^{-6}$  se pipetază câte 1 ml în două rânduri de eprubete sterile. Unul din aceste rânduri se încălzește 15 minute la  $80^{\circ}\text{C}$ , pentru distrugerea formelor vegetative. Apoi, în fiecare eprubetă din ambele rânduri, se pipetează câte 9—10 ml de mediu Wilson-Blair, se omogenizează conținutul, prin rularea eprubetelor între palme, și se răcesc brusc eprubetele în apă rece. Urmează o incubare de 24 ore la  $43^{\circ}\text{C}$ . În prezența *C.perfringens* apar, chiar după 2—3 ore, colonii negre și rupturi în mediu din cauza producerii de gaz. Pe frotiurile pregătite din colonii depistăm bastonașe caracteristice gram pozitive.

■ *Metoda Sidorenko-Pivovarov* utilizează mediul sulfit-polimixină-neomicină (SPN).

Antibioticele din mediu inhibă flora asociată. Coloniile negre, care apar după incubarea culturii la 44—45°C, nu mai trebuie identificate. Analiza durează 10—12 ore.

■ *In medii de îmbogățire* (e.g. in eprubete cu mediul Kitt-Tarozzi regenerat în prealabil prin fierbere) se însămânțează câte 1 ml din diluțiile încălzite și din cele native. După o incubare de 18—20 ore la 37°C, se repică câte 0,5—1,0 ml din eprubetele cu turbiditate în mediul Wilson-Blaire sau SPN, urmărind creșterea ca în metodele descrise mai sus.

### 58.2.6. Determinarea microorganismelor termofile

Temperatura optimă pentru cultivarea microorganismelor termofile este de 58—60°C. Microorganismele termofile nu sunt caracteristice solurilor poluate. Solul care conține mulți coliformi și puține microorganisme termofile este considerat poluat cu materii fecale, din cauză că microflora intestinală a omului și animalelor este foarte săracă în termofili. Termofili sunt reprezentați de bacili grampozitivi sporulați și actinomicete care se multiplică activ în composturi și gunoi. De aceea depistarea unei concentrații sporite de coliformi și termofili indică îngrășarea solului cu gunoi de grajd (băligar) sau composturi. Pentru depistarea microorganismelor termofile, se însămânțează diluțiile suspensiilor de sol (de la 10<sup>-1</sup> până la 10<sup>-6</sup>) paralel pe 2—3 plăci cu geloză turnată în strat mai gros. Se incubează apoi plăcile 24 ore la 60°C, se numără coloniile și se calculează câte UFC revin la 1 g de sol.

### 58.2.7. Determinarea microorganismelor patogene

Solul este poluat, de regulă, cu excrețiile omului și animalelor, cu diverse deșuri menajere o dată cu care pot pătrunde și microorganisme patogene. Din sol microbii pătrund în bazinele acvatice, contaminează legumele, fructele, produsele alimentare, alte elemente de mediu. Solul joacă un rol considerabil în cazul tetanosului, infecției anaerobe gazoase, botulismului, precum și în transmiterea antraxului, leptospirozelor, toxiiinfecțiilor alimentare, febrei tifoide, dizenteriei ș.a.

#### 58.2.7.1. Determinarea salmonelelor și shigelelor

Solul poate fi contaminat cu salmonele în urma poluării cu materii fecale, mai ales ale animalelor la care salmonelele sunt comensale sau determină infecții acute. Shigelele pătrund în sol cu materiile fecale ale omului. Pentru depistarea salmonelelor se folosesc două metode: însămânțarea în mediul de îmbogățire și coagularea cu însămânțarea ulterioară pe medii selectiv-diferențiale.

■ *Însămânțarea în mediul de îmbogățire* este o metodă mai simplă. În suspensia de sol pregătită se introduc toți componenții mediului cu magneziu (mediul «M») corespunzător cu volumul suspensiei. După incubarea de 18—20 ore la 37°C, se fac repicări pe 3—5 plăci cu mediul bismut-sulfit. Identificarea coloniilor suspecte se efectuează după metoda obișnuită pentru salmonele.

■ *Metoda coagulării și centrifugării după Fiker*. Pentru concentrarea salmonelelor, la 500 ml suspensie de sol se adaugă 1,7 ml soluție sterilă 10% sulfat de fier și 2 ml soluție 10% bicarbonat de sodiu (mediul alcalin favorizează coagularea). Se amestecă suspensia minuțios cu coagulantul și se menține o oră la 4°C. Flacoanele de coagul sedimentează spontan împreună cu bacteriile. Centrifugăm acest sediment 5 minute la 5000 rpm. Se

decantează supernatantul și se solvă sedimentul centrifugării, adăugând, cu picătura, soluție sterilă 25% tartrat de potasiu, apoi se însămânțează câte 0,5—1,0 ml pe mediile Ploskirev și Wilson-Blair cu incubare la 37°C. Peste restul sedimentului solvit se adaugă 50 ml bulion biliat 10—20%. După 5 și 20 ore de incubare la 37°C, din bulionul biliat se fac repicări pe medii diferențiale. Izolatele suspecte a fi *Salmonella* se identifică după metoda uzuală.

Shigelele se depistează paralel, efectuând însămânțarea suspensiei de sol în mediul cu selenit și repicare ulterioară pe medii diferențiale cu identificarea coloniilor suspecte.

#### 58.2.7.2. Determinarea *C.tetani*

Se triturează într-un mojar steril 20—30 g sol. Se amestecă apoi 3—5 g din omogenat cu 8—15 ml soluție salină izotonă și se lasă 3—4 ore, pentru a se limpezi la temperatura camerei. Se injectează subcutan câte 1 ml suspensie la 4 șoareci, dintre care doi au fost în prealabil protejați cu ser antitetanic. Moartea șoarecilor neprotejați și supraviețuirea celor de control indică prezența *C.tetani*.

În caz de necesitate, se izolează bacilul tetanic în cultură pură după metoda de izolare și identificare a anaerobilor sporulați.

#### 58.2.7.3. Determinarea *C.botulinum*

Se mojarază aseptice două probe de 20—30 g sol, care se introduc apoi în baloane cu 80—100 ml mediu Kitt-Tarozzi. Unul din baloane se încălzește 30 minute la 80°C, pentru distrugerea florei nesporulate, apoi se incubează ambele baloane la 37°C. După 8—14 zile se fac repicări, pentru obținerea culturii pure. Toxina o depistăm prin *proba biologică*, pentru care se injectează subcutanat 6 șoareci cu câte 0,5 ml suspensie de sol după cum urmează:

- 2 șoareci cu suspensia nativă,
- 2 șoareci cu suspensia inactivată termic,
- 2 șoareci cu amestec al suspensiei native cu ser antibotulinic polivalent.

Proba este pozitivă dacă supraviețuiesc numai șoarecii la care am injectat amestecul suspensie nativă cu ser antibotulinic polivalent.