

**Санитарная
микробиология воды.**

**Санитарно-
микробиологический
контроль воды,
используемой для
фармацевтических целей.**

- Вода является естественной средой обитания разнообразных микроорганизмов.
- В пресной и соленой воде выявляют представителей всех таксономических групп бактерий, многих простейших и грибов.
- На качественный состав микробиоты существенное влияние оказывает происхождение воды как среды обитания.

Водоемы

- *Поверхностные* (реки, озера, водохранилища, пруды)
- *Подземные* (почвенные, грунтовые, артезианские)
- *Солёные* (морья, озера)

Микробиота водоемов



**Аутохтонные
микроорганизмы
(водные)**



**Аллохтонные
микроорганизмы
(попадающие при
загрязнении)**

Загрязнение водоемов происходит

при попадании:

- Промышленных вод (особенно с предприятий пищевой промышленности)
- Хозяйственно-фекальных вод
- Талых вод
- Ливневых вод

Аутохтонная микробиота

- совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде.
- Как правило микробный состав воды напоминает микробиоту почвы, с которой она соприкасается.
- Состав: *Micrococcus candicans*, *Micrococcus roseus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas fluorescens*, различные виды *Proteus* и *Leptospira*, *Bacillus cereus*, *Bac. mycoides*, *Chromobacterium*, *Clostridium*.
- В воде часто обнаруживают цианобактерии, водные грибы, простейшие.

Микроорганизмы воды принимают участие в круговороте веществ, расщепляя органические соединения, обеспечивают питанием других обитателей водоемов.

**В результате микробного загрязнения
при попадании неочищенных
городских отходов и стоков в воду
могут проникать возбудители
инфекционных заболеваний:
холеры, брюшного тифа и паратифа
А, В, лептоспирозов, иерсиниозов,
кампилобактериозов, туляремии,
полиомиелита, гепатита и др.**

По количеству микроорганизмов в воде различают:

```
graph TD; A[По количеству микроорганизмов в воде различают:] --> B[олигосапробные зоны]; A --> C[мезосапробные зоны]; A --> D[полисапробные зоны (sapro — гниение)];
```

олигосапробные зоны

мезосапробные зоны

полисапробные зоны (*sapro* — гниение)

- **Полисапробные зоны (зоны сильного загрязнения)**
содержат большое количество разлагающихся органических веществ и почти полностью лишены кислорода. Количество бактерий до 10^6 /мл. Видовой состав ограничен анаэробными бактериями, грибами, актиномицетами.
- **Мезосапробные зоны (умеренного загрязнения)**
характеризуются разнообразным качественным составом микроорганизмов; в основном это нитрифицирующие, облигатно анаэробные бактерии, а также представители *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* и др. Общее количество — 10^5 кл/мл.
- **Олигосапробные зоны (зоны чистой воды)**
характеризуются небольшим содержанием органических соединений и окончанием минерализации. Количество бактерий — 10^3 кл/мл.

Вода как один из видов сырья и вспомогательных материалов

Вода в фармацевтическом производстве используется



**в качестве основного
материала**



**в качестве вспомогательного
материала**

Вода в фармации

- Вода является компонентом питательных сред и готовых лекарственных форм.
- Воду используют в технологии выделения и очистки БАВ
- Воду используют для санитарной подготовки помещений и оборудования
- Воду используют для приготовления растворов дезинфектантов и антисептиков.

В технологических процессах используют воду

Питьевую воду из
центральных систем
хозяйственно-питьевого
водоснабжения

Очищенную воду,
получаемую на производстве
методами дистилляции,
ионного обмена, обратного
осмоса, электродиализа

В производстве стерильных лекарственных препаратов
используют **воду для инъекций**, которую получают
из очищенной воды.

Санитарно-показательные микроорганизмы для воды

- Общие колиформные и термотолерантные кишечные палочки.
- *Cl.perfringens*, *Cl.sporogenes* и бактериофаги.
- При необходимости определяют фекальные энтерококки (*E.faecalis*).

- При санитарно-микробиологическом анализе воды питьевой определяют **общее микробное число (ОМЧ)** — количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл воды и **количество санитарно-показательных микроорганизмов.**

- В соответствии с **Санитарными правилами и нормами 2.1.4.1074-01 к воде центрального водоснабжения** предъявляются следующие требования:

- ОМЧ не более 50 клеток/мл
- Не допускается в 100 мл присутствия общих колиформных и термотолерантных бактерий
- Не допускается присутствие колифагов
- Не допускается присутствия сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл
- Не допускается присутствия цист лямблий в 50 мл

В **фармакопее** содержатся
требования для следующих
категорий воды:

- **фармакопейная статья**

2.2.0020.15 «Вода очищенная»

- **фармакопейная статья**

2.2.0019.15 «Вода для инъекций»

- **Вода питьевая не описана в фармакопее, но она должна соответствовать требованиям нормативных документов относительно качества воды,** утвержденным компетентным уполномоченным органом.
- Для подтверждения качества воды на производственном участке следует проводить испытания.

Методика санитарно-бактериологического исследования питьевой воды

- Отбор воды из крана производится после его стерилизации обжиганием и последующего спуска не менее 10 минут при полностью открытом кране. Пробу воды отбирают непосредственно из крана без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок.

- В емкости для воды должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась.
- Доставка воды в контейнерах-холодильниках при температуре $+4-10^{\circ}\text{C}$.
- От момента забора до начала исследования должно пройти не более 6 часов.

Определение общего микробного числа воды

- **ОМЧ** – общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 мл воды, способных образовать колонии на питательном агаре при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов, видимые с увеличением в 2 раза.

Выполнение анализа.

- Из каждой пробы делают посев не менее 2-х объемов воды по 1 мл.
- 1 мл вносят в стерильные чашки Петри, затем вливают 8-12 мл расплавленного и охлажденного до $+50^{\circ}\text{C}$ питательного агара, быстро смешивая содержимое чашки.
- После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на 24 часа.

Учет результатов.

- Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза.
- Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на 2.
- Результат – число колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл воды.
- В норме ОМЧ не более 50 КОЕ в 1 мл воды

- Для выявления плесневых и дрожжевых грибов исследуемую воду засевают по 0,5 мл на среду Сабуро (пептонный агар с мальтозой или глюкозой) и инкубируют при комнатной температуре 3-4 суток.
- Подсчитывают число выросших колоний и рассчитывают среднее арифметическое.
- Результат (ОМЧ) вычисляют путем суммирования среднего арифметического числа бактерий со средним арифметическим дрожжевых и плесневых грибов и выражают результат в КОЕ/мл.

Санитарно-микробиологический контроль воды водопроводной

1 д е н ь	Вода водопроводная	В стерильную чашку Петри внести 1 мл воды, затем влить расплавленный и охлажденный до +50° С питательный агар. Быстро смешать содержимое чашки. После застывания агара чашки с посевом поместить в термостат при температуре +7°С на 24 часа.	
2 д е н ь	Рост колоний на поверхности и в толще питательного агара	Рассчитать общее микробное число воды, сделать заключение.	Заклю- чение

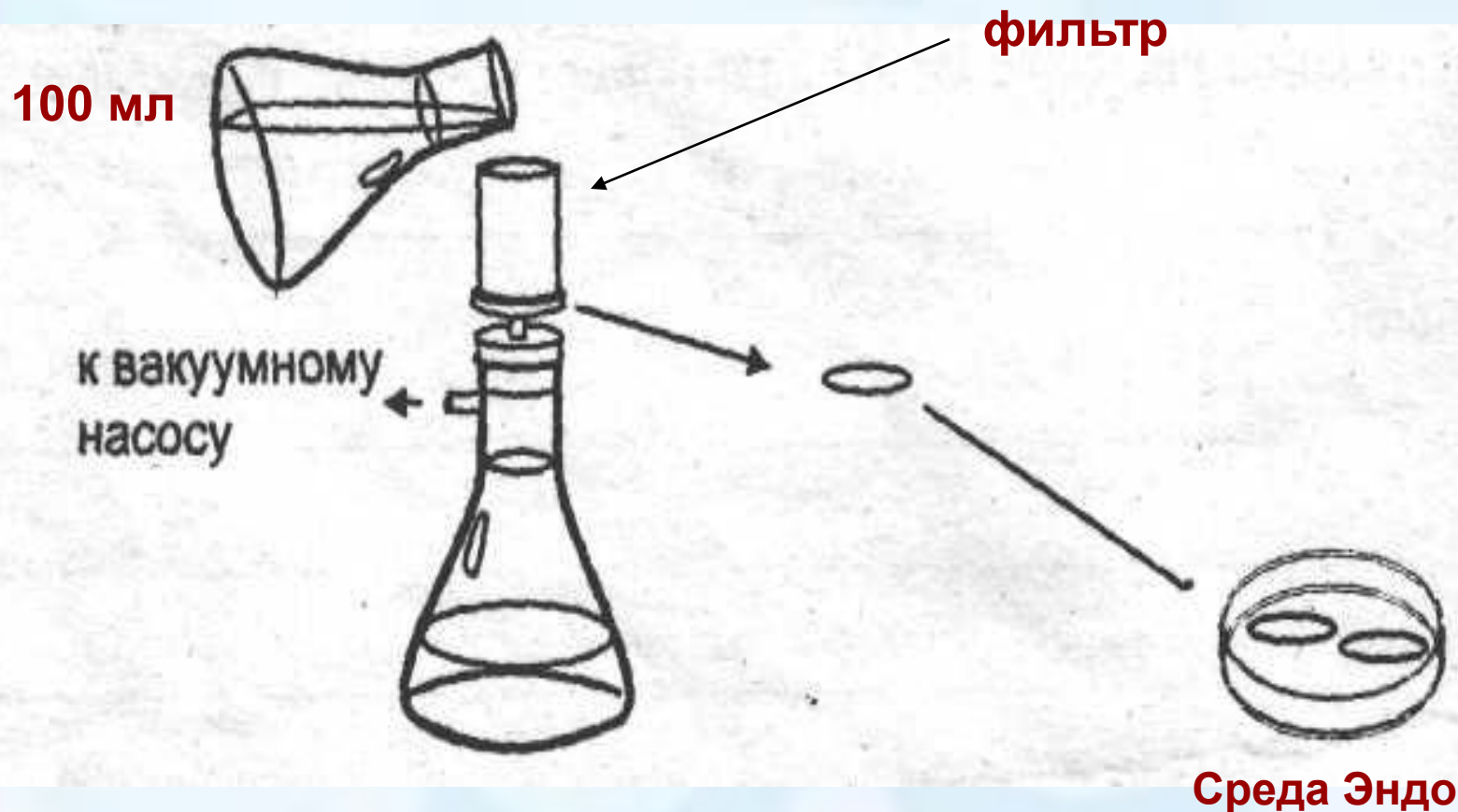
Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий

- **Общие колиформные бактерии (ОКБ)** – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах и ферментирующие лактозу при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов.
- **Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)** входят в число ОКБ, обладая всеми их признаками, и, кроме того, ферментируют лактозу до кислоты и газа при температуре $+44^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов.

Основной метод для определения колиформных бактерий

- **Метод мембранной фильтрации**
- В основе метода - фильтрация определенных объемов исследуемой воды через мембранные фильтры с последующим выращиванием посевов на дифференциальной среде с лактозой и идентификацией их по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам для обнаружения колиформных бактерий.

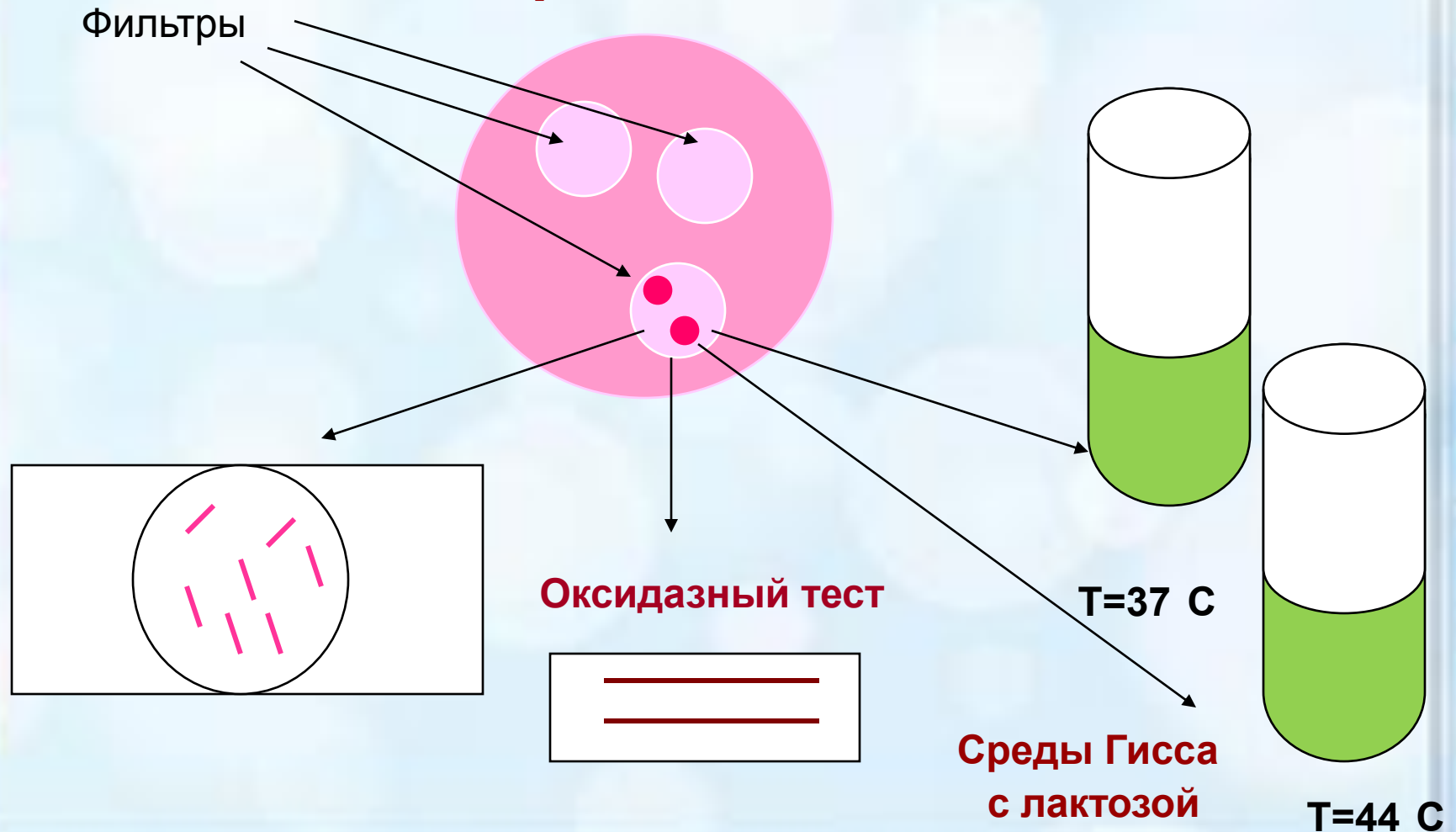
Определение колиформных бактерий



- Посевы инкубируют в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 24 часов

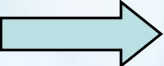
Обнаружение колиформных бактерий

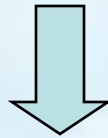
Среда Эндо



Инкубация в термостате в течение 18-24 часов

Тесты для идентификации **общих
колиформных бактерий и
термотолерантных колиформных бактерий**

- 1. Грам – палочки**
- 2. Тест на наличие цитохромоксидазы
(оксидазный тест)  оксидаза «-»**
- 3. Ферментация лактозы при 37 С и при
44 С в течении 24 часов**



Вода контаминирована ОКБ или ТКБ

1 День	Вода Водопроводная	Профильтровать 3 объема воды по 100 мл через мембранные фильтры, поместить фильтры на поверхность среды Эндо	
2 день	Рост колоний на фильтрах на среде Эндо	1. Определить количество и изучить свойства лактозопозитивных колоний. 2. Провести бактериоскопию с окраской по Граму 3. Провести оксидазную пробу 4. Произвести посев материала из колоний, принадлежащих к колиформным бактериям, в пробирки со средой Гисса с лактозой, инкубация 24 часа при +37°С и при +44°С	Заключение

3 день	Рост культур на среде Гисса с лактозой	1. Оценить расщепление лактозы 2. Рассчитать количество ОКБ и ТКБ, сделать заключение	Заключение
-----------	--	--	------------

Формула для определения ОКБ или ТКБ в 100 мл воды:

$$X = (A \cdot 100) / V$$

X- число КОЕ/100мл воды.

V- профильтрованный через фильтры объём воды

A – число колоний ОКБ и ТКБ.

Вода очищенная

**Это нефасованная очищенная вода,
которую получают из воды питьевой
методами:**

- **дистилляции**
- **ионного обмена**
- **обратного осмоса**
- **комбинация методов**

Вода очищенная предназначена:

- для производства или изготовления лекарственных средств
- для получения воды для инъекций
- для проведения испытаний лекарственных средств
- для приготовления лекарственных средств, изготавливаемых в асептических условиях

Воду очищенную необходимо подвергать стерилизации.

Вода очищенная не должна содержать антимикробных консервантов или других добавок.

Вода очищенная

Должна соответствовать определенным требованиям, изложенным в соответствующей фармакопейной статье:

- Бесцветная прозрачная жидкость без запаха.
- рН от 5,0 до 7,0.
- Иметь определенную кислотность и щелочность.
- Иметь определенную электропроводность.

Воду очищенную используют свежеприготовленной или хранят в закрытых емкостях, изготовленных из материалов, не изменяющих свойства воды и защищающих ее от инородных частиц и микробиологических загрязнений, не **более 3 суток.**

Воду для инъекций используют свежеприготовленной или хранят при температуре от 5 С до 10 С или от 80 С до 95 С в закрытых емкостях, изготовленных из материалов, не изменяющих свойств воды, защищающих ее от попадания механических включений и микробиологических загрязнений, не **более 24 часов.**

Микробиологическая чистота воды очищенной

Не более 100 микроорганизмов в 1 мл.

Не допускается содержание бактерий
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* в
100 мл.

**Испытание проводят методом
мембранной фильтрации в
соответствии с ОФС
«Микробиологическая чистота» п.12**

Микробиологическая чистота воды для инъекций

Общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 10 КОЕ в 100 мл.

Не допускается содержание бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл.

Испытание проводят методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» п.12

**Методика проведения
микробиологической чистоты
воды очищенной и воды для инъекции**

- Для анализа необходимо взять образец в объеме не менее 1000 мл.
 - Используется метод мембранной фильтрации в асептических условиях.
- Для посева используют мембранные фильтры из нитроцеллюлозы с диаметром пор не более 0.45 мкм и внешним диаметром 47 мм.
- Для смачивания фильтра применяют стерильный 0,9 %раствор натрия хлорида (не менее 5 мл).

Питательные среды

**Для определения общего числа
аэробных микроорганизмов:**

- Соево-казеиновый агар или
- Среда №1

Для определения грибов

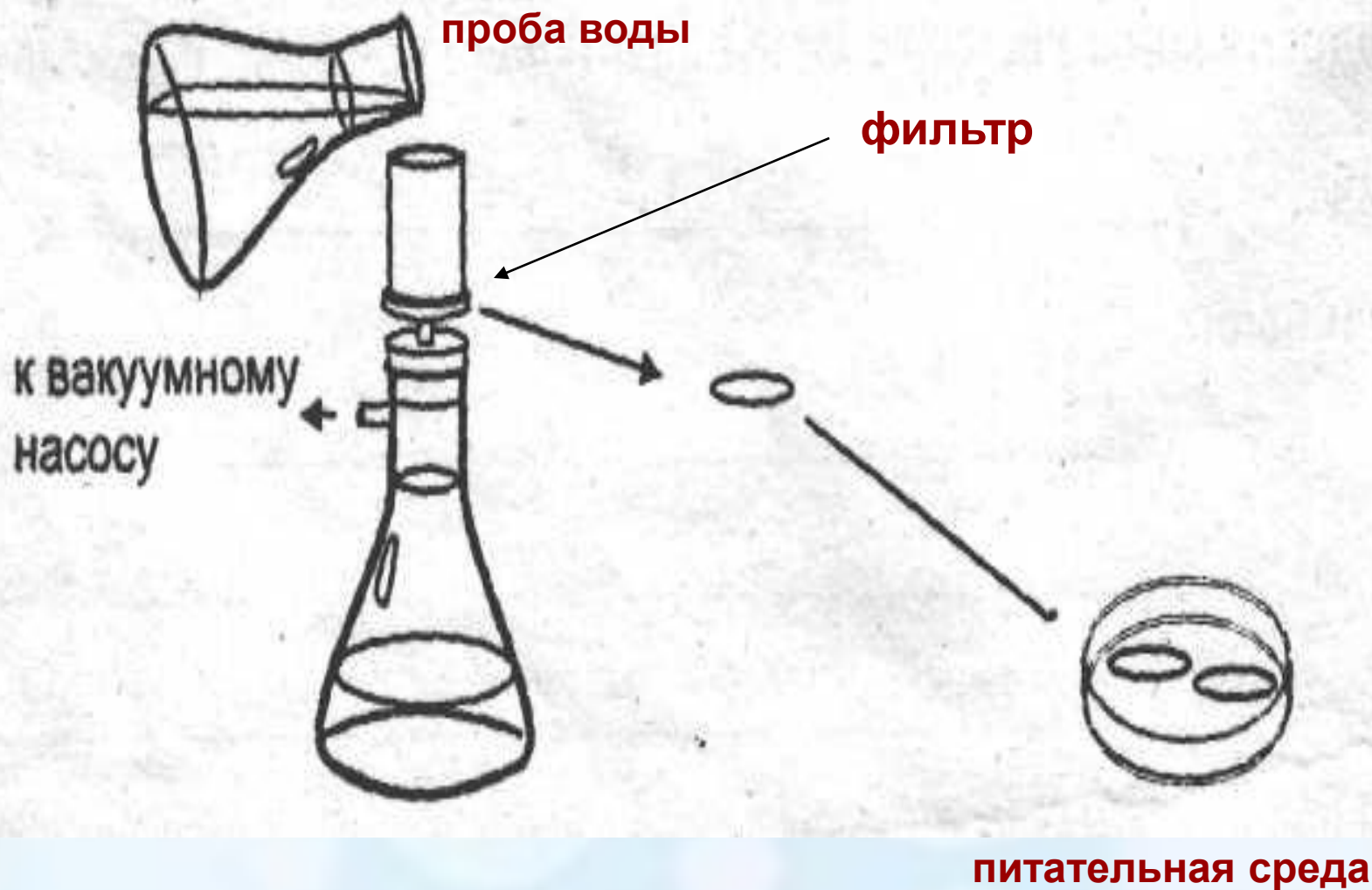
- Среда Сабуро или
- Среда №2

- Для определения общего числа аэробных микроорганизмов **воды очищенной** фильтруют один из следующих объемов воды очищенной:

- **1 мл**
- 10 мл
- 100 мл

(в двойной повторности)

- Для определения общего числа аэробных микроорганизмов **воды для инъекций** фильтруют:
 - 100 мл
(в двойной повторности)



- Посевы инкубируют в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 5 суток

Учет результата

- Производят подсчет колоний через 48-72 часа (предварительные результаты), через 5 суток (окончательные результаты)
- Определяют среднее арифметическое число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов суммарно) в 1 мл воды очищенной

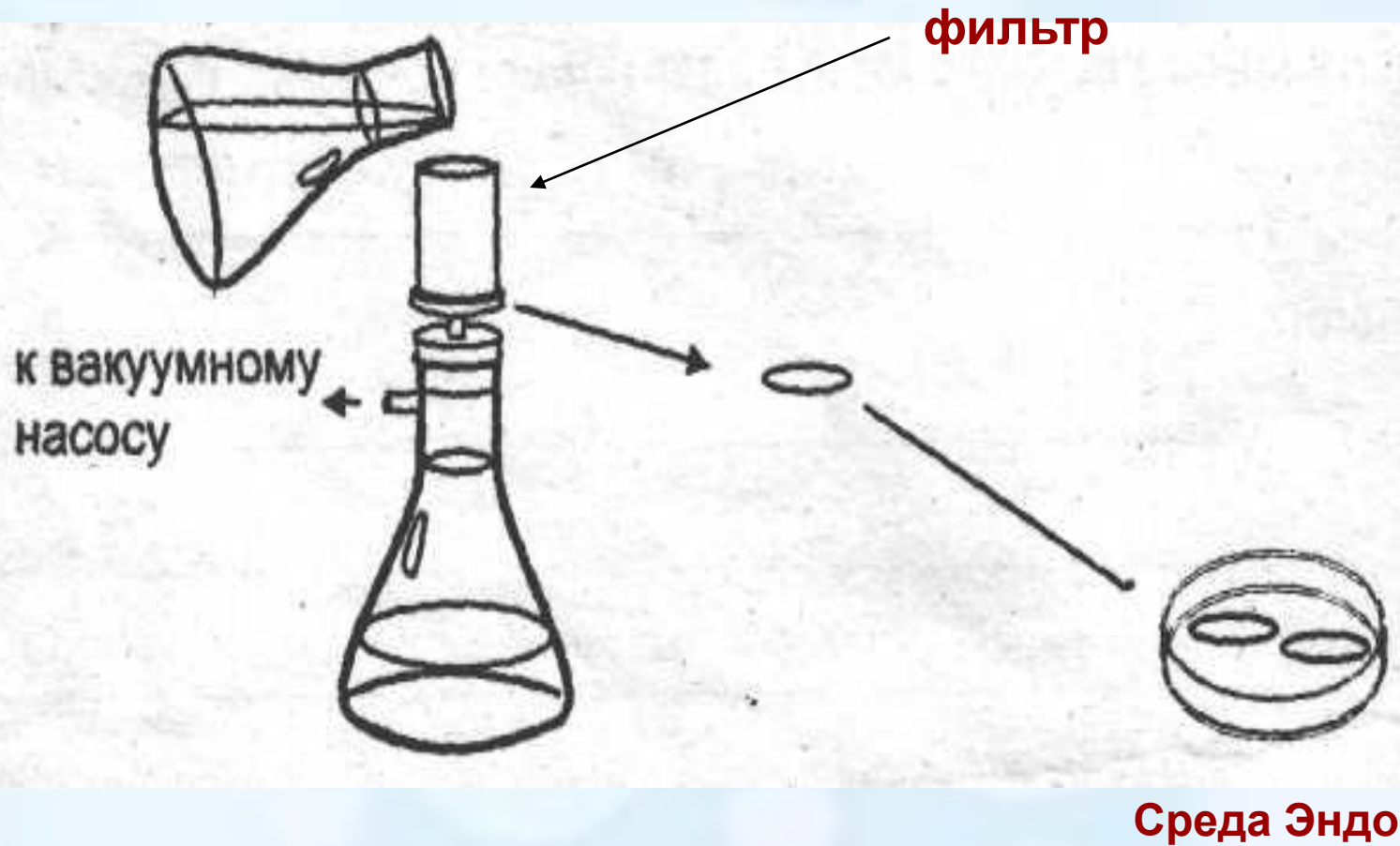
Определение *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

**Воду очищенную и воду для инъекций
фильтруют в объеме 100 мл в
двойной повторности.**

Питательные среды

- Среда Эндо (определение *E.coli*) или
- Среда № 4
- Среда № 9 (определение *P.aeruginosa*)
- Маннитно-солевой агар (желточно-солевой агар) (*S.aureus*) или
- Среда № 10

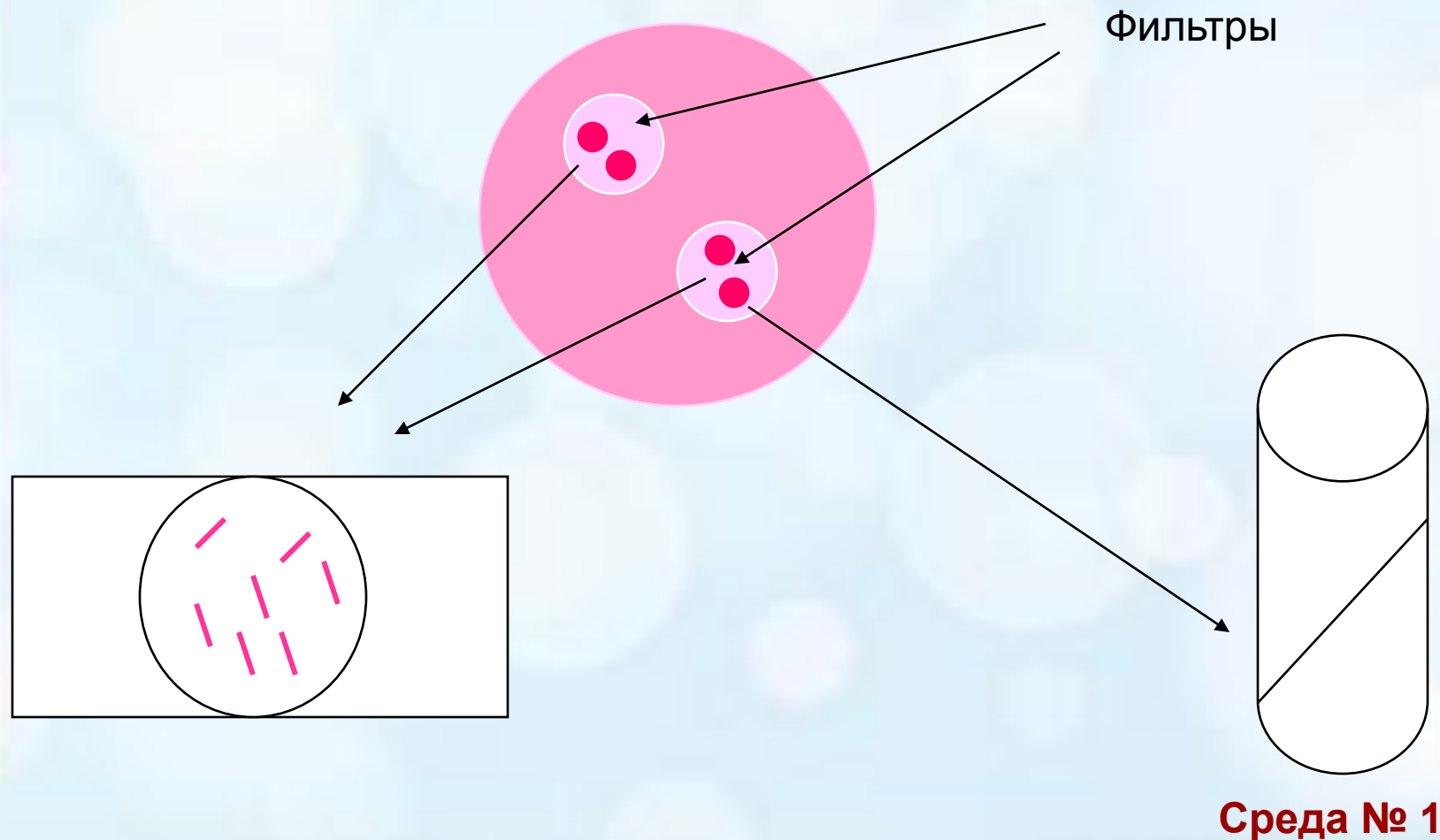
Определение E.coli



- Посевы инкубируют в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 24 часов

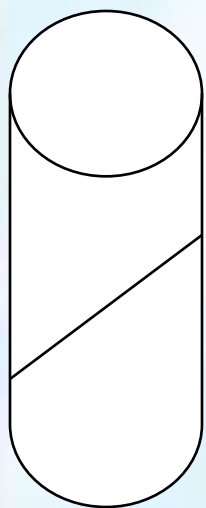
Обнаружение E.coli

Среда Эндо

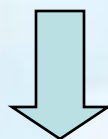


Инкубация в термостате в течение 18-24 часов

Тесты для идентификации **E.coli**

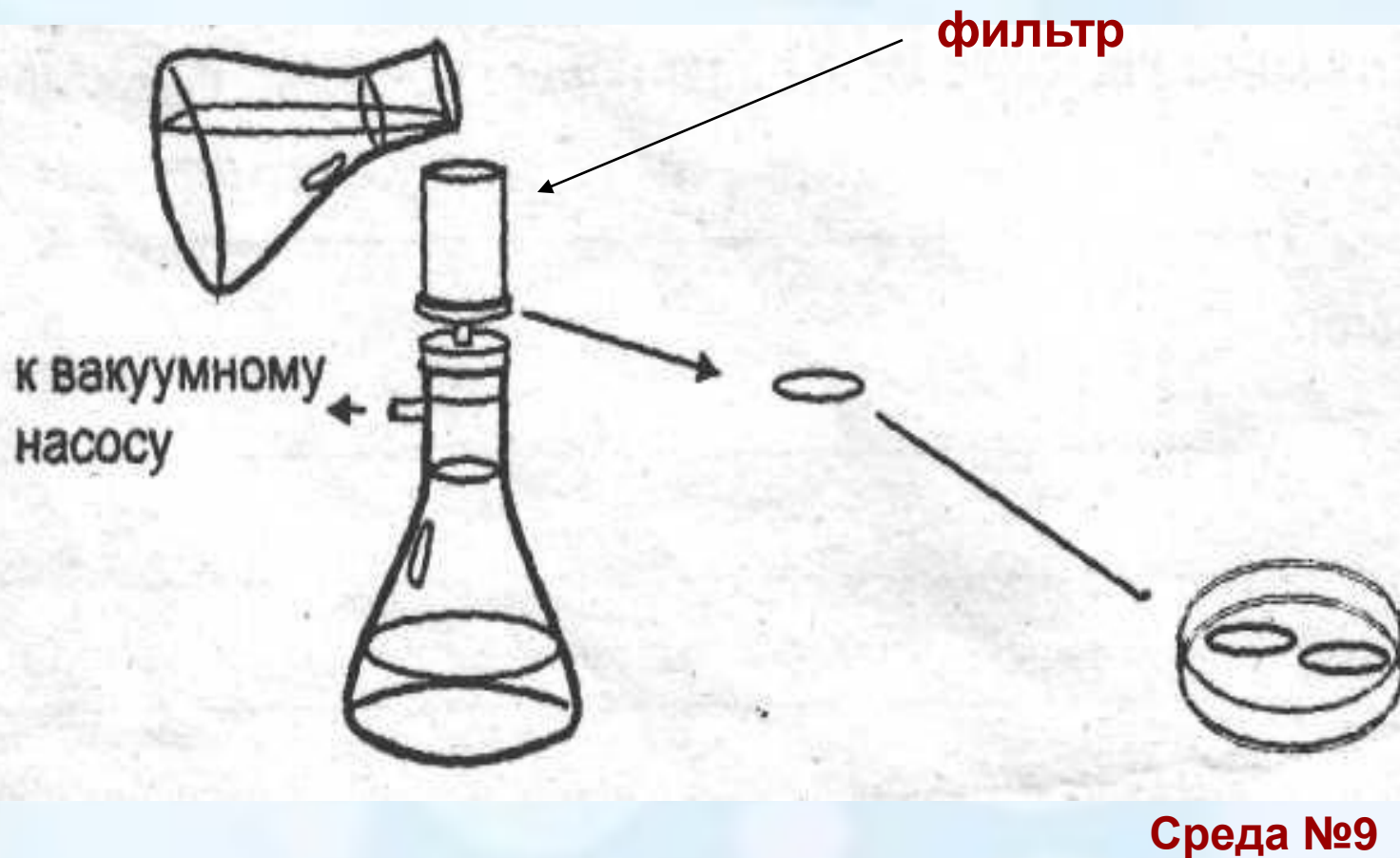


1. Грам – палочки
2. Тест на наличие цитохромоксидазы (оксидазный тест («—»))
3. Тест на наличие индола («+»)



Вода контаминирована E.coli

Определение *P.aeruginosa*



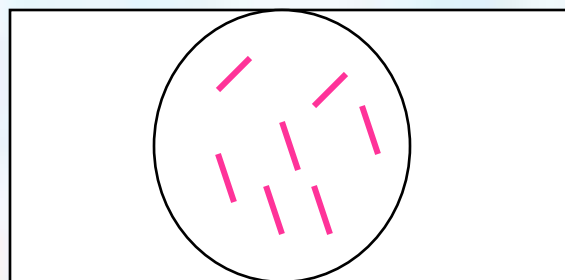
- Посевы инкубируют в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 24-48 часов

Обнаружение *P.aeruginosa*

Среда № 9

Сине-зеленный пигмент
пиоцианин

Фильтры



Фермент цитохромоксидаза +



**Вода загрязнена
*P.aeruginosa***

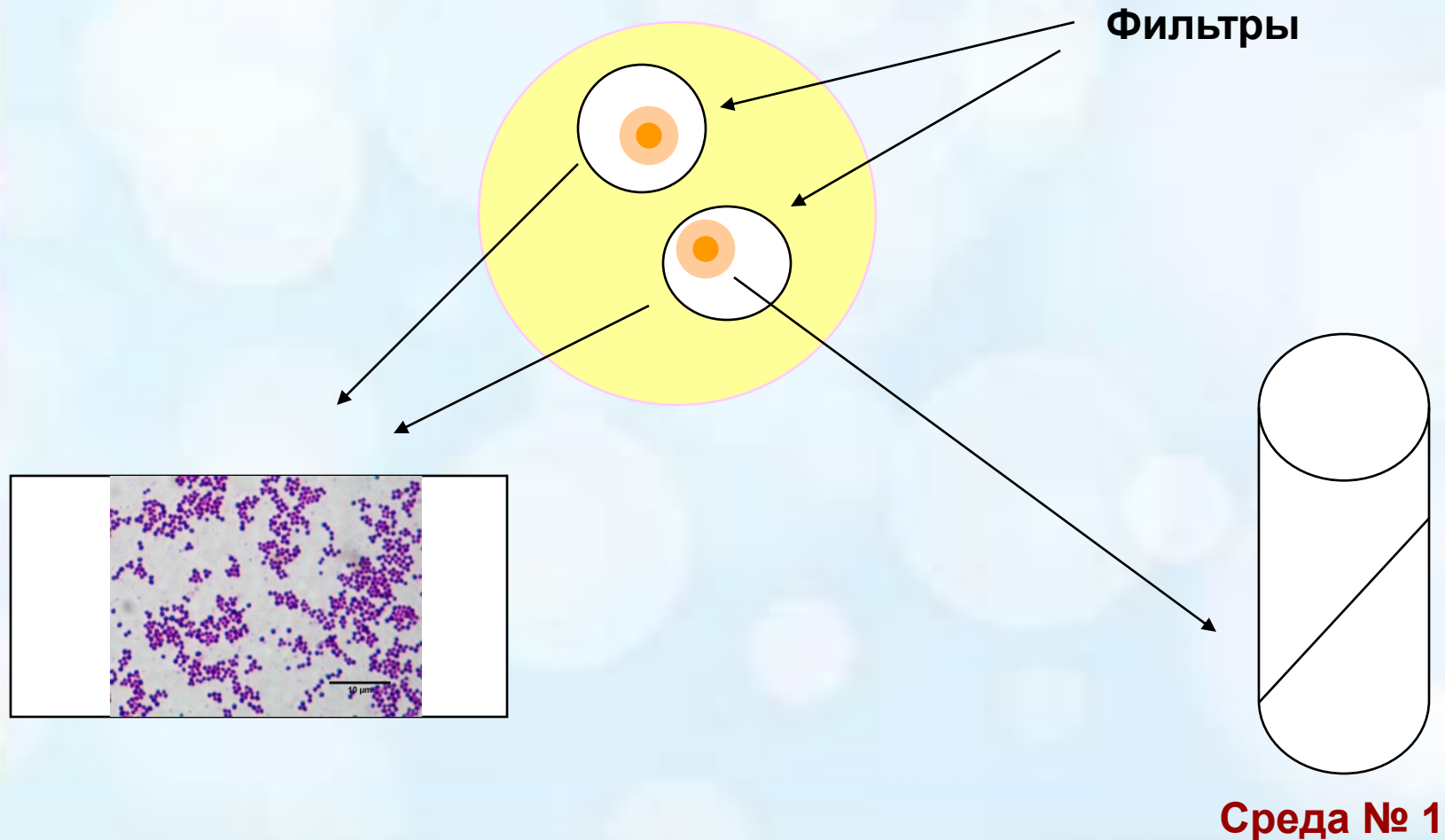
Определение *S.aureus*



- Посевы инкубируют в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)$ °C в течение 24-48 часов

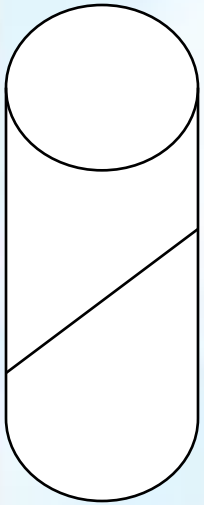
Обнаружение *S.aureus*

Среда № 10



Инкубация в термостате в течение 18-24 часов

Тесты для идентификации **S.aureus**



1. Грам + кокки, в виде грозди
2. Ферментация маннита «+»
3. Наличие фермента коагулазы «+»



Вода контаминирована S.aureus

Дата, день	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
2 день	Рост колоний на фильтрах на среде № 1 и среде № 2	<p>1. Подсчитать количество колоний на фильтрах на среде № 1 и № 2.</p> <p>2. Определить среднее арифметическое число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов суммарно) в 1 мл воды очищенной.</p> <p>Оценить результат.</p>	

Оценка микробиологической чистоты воды очищенной

День	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 день	Вода очищенная	<p>Профильтровать 3 объема воды очищенной по 100 мл через 3 фильтра (в двойной повторности)</p> <p>2. Фильтры поместить на среду №4 (Эндо) и среду № 9, среду №10 (ЖСА).</p> <p>3. Посевы инкубировать в термостате при температуре 32,5 2,5 С в течение 24 часов.</p>	

День	материал	Что сделать	Результат
2 день	Рост колоний на фильтрах на среде № 4, среде №9 среде №10	<p>1. Подсчитать количество колоний на фильтрах на среде № 4, № 9, № 10.</p> <p>2. При наличие роста бактерий на фильтрах провести идентификацию в зависимости от питательной среды, на которой определяется рост.</p>	