



ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ БЮРО
КОПЕНГАГЕН

EUR/ISP/EHAZ 94 01/WS01(S)
04245

Оригинал: Английский
ЕРБ/ЗДВ, задача 20
21 марта 1995 г.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЗАГРЯЗНЕНИЯ МОРСКОЙ СРЕДЫ

(Совместный проект ВОЗ/ЮНЕП, Фаза II МЕД ПОЛ)

Краткий отчет о Первых национальных курсах обучения и практикуме
по интеркалибровке

Афины, 21 - 26 ноября 1994 г.

РЕЗЮМЕ

Факультетом микробиологии Национального института общественного здравоохранения Афин были организованы, при спонсорстве со стороны ВОЗ и Программы Организации Объединенных Наций по окружающей среде, курсы по методике микробиологического мониторинга. В работе курсов участвовали одиннадцать микробиологов из девяти лабораторий в Греции, а также два участника из Хорватии и Марокко, которые будут организовывать аналогичные курсы в их собственных странах в 1995 г. Участники провели микробиологические исследования по выявлению бактериальных показателей фекального загрязнения и некоторых патогенов. Из полученных результатов явствовало, что стандартных ошибок гораздо меньше при оценках МФ (мембранная фильтрация), чем при оценке НВЧ (наиболее вероятного числа), однако оснований для предположения различий между самими методами не было. Кроме того, результаты показали также значительно большие различия данных у разных наблюдателей, чем только у одного наблюдателя лишь в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Данный отчет издан на английском, немецком, русском и французском языках, и Европейское региональное бюро ВОЗ оставляет за собой все права, связанные с настоящим документом. Тем не менее его можно свободно рецензировать, реферировать, воспроизводить или переводить на любой другой язык. Не разрешается лишь продажа документа, либо иное его использование в коммерческих целях. На название и эмблему ВОЗ распространяются соответствующие положения об охране авторских прав, и они не могут быть использованы без соответствующего разрешения на перепечатках или переводах настоящего документа. Всю ответственность за любые взгляды, выраженные в подписанных авторами статьях, несут сами авторы. Региональное бюро будет признательно, если ему будут представлены три экземпляра любого перевода данного отчета.

ЗАДАЧА 20

КАЧЕСТВО ВОДЫ

К 2000 г. все люди должны иметь доступ к адекватным системам питьевого водоснабжения, а загрязнение грунтовых вод, рек, озер и морей не должно более представлять угрозу для здоровья человека.

Введение

В соответствии с положениями Конвенции 1976 г. о защите Средиземного моря от загрязнения и Протокола 1980 г. о защите Средиземного моря от загрязнения из наземных источников договаривающиеся стороны взяли на себя обязательства по созданию системы мониторинга загрязнения морской среды для района Средиземноморья и по систематической оценке, насколько это представится возможным, уровня загрязнения вдоль этого побережья.

Для содействия достижению этих целей решающим фактором в разработке национальных программ мониторинга загрязнения в странах Средиземноморья была Долгосрочная программа мониторинга загрязнения и исследований в Средиземном море (Фаза II МЕД ПОЛ). Все эти программы включают определение концентраций бактерий в прибрежных рекреационных водах и, где это применимо, в районах выведения моллюсков и ракообразных. В результате данных усилий был усовершенствован целый ряд имеющихся микробиологических лабораторий и были созданы новые лаборатории. Это привело к необходимости повышения уровня квалификации персонала, а также согласования методологии, применяемой различными учреждениями в различных странах для обеспечения сравнимости результатов и проведения на регулярной основе региональных оценок.

Начиная с 1994 г. была прекращена практика организации курсов обучения микробиологическим методам мониторинга загрязнения морской среды на общерегиональном уровне; вместо этого было решено отдать предпочтение проведению учебных курсов в странах. На двухгодичный период до 1994-1995 гг. было запланировано провести три таких курса.

Эти курсы и практикум, проводящиеся в качестве первого из серии мероприятий такого рода, были организованы Греческим институтом общественного здравоохранения в сотрудничестве с ВОЗ и Программой Организации Объединенных Наций по окружающей среде (ЮНЕП) и были посвящены рассмотрению нижеследующих вопросов:

- дальнейшее обучение персонала микробиологических лабораторий из учреждений стран Средиземноморья, участвующих в Фазе II программы, путем ознакомления их с согласованными совместными методами определения основных бактериальных параметров применительно к морской воде, моллюскам и ракообразным;

- активизация контактов и связей между научными работниками различных лабораторий путем обсуждения совместных проблем в области внедрения соответствующих микробиологических методов;
- повышение сравнимости результатов, полученных в рамках микробиологического компонента программы путем интеркалибровки (взаимных сличений) данных;
- вынесение рекомендаций для будущих учебных курсов.

Методы

Лабораторный раздел курсов включает микробиологические исследования для выявления бактериальных показателей фекального загрязнения и некоторых патогенов. Были подготовлены пробы природной морской воды с добавлением стандартных бактериальных штаммов. Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) и метод мембранной фильтрации (МФ) были применены нижеследующим образом:

а) Метод НВЧ

- цельные бактерии кишечной группы, фекальные бактерии кишечной группы, *E. coli*: две бульонные культуры (глутаматная среда, модифицированная минералами, бульон лаурилтриптозы);
- *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый): (бульон m-*Staphylococcus* (модифицированный), на агаре VJ);

б) Метод МФ

- цельные бактерии кишечной группы, фекальные кишечные бактерии, *E. coli*: (культура на m-лаурилсульфатном агаре, агар m-FC);
- энтерококки: (агар Сланец и Бартли);
- *Pseudomonas aeruginosa* (палочка синегнойная): (на агаре *Pseudomonas*);
- *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый): (агар 4-S);
- *Campylobacter jejuni*: (бульон Престона, агар Скирроу);
- *Salmonella*: (стандартная процедура предварительного обогащения - обогащения - изоляции).

Фильтрование для выделения цельных бактерий кишечной группы (total coliforms), фекальных кишечных бактерий, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков проводилось способом дублирования. Был проведен статистический анализ данных количественных измере-

ний (бактерий кишечной группы, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и энтерококков).

Результаты

К числу рассмотренных подробным образом аспектов данных относятся:

- сравнение результатов метода НВЧ с использованием различных данных;
- сравнение результатов метода МФ с использованием иного фильтра;
- сравнение между результатами НВЧ и МФ;
- оценка вариантов, получаемых одним наблюдателем, и различными наблюдателями.

Сводные статистические данные по замерам микробных плотностей приводятся в табл. 1, где дается описание бактериальных плотностей в пробах, предоставленных для лабораторной работы (см. таблицы в Приложении 1). Можно отметить, что число стандартных ошибок было гораздо меньше при оценках методом МФ по сравнению с методом НВЧ. Это является отражением того факта, что подсчеты методом МФ проводились в двойном экземпляре. Результаты сравнений, когда использовались различные среды, фильтры и методы, приводятся в табл. 2. Во всех случаях

было ясно, что нет оснований предполагать, что результаты меняются в зависимости от примененных методов. Из табл. 3 явствует расхождение данных двойных измерений в зависимости от наблюдателя. При этом оказывается, что разрыв, различие является чрезмерно большим и поэтому неприемлемым лишь в двух случаях. В табл. 4 показаны результаты ANOVA - свидетельство того, что результаты данного лабораторного практикума говорят о значительно более высоком отклонении данных одного наблюдателя, чем у разных наблюдателей лишь применительно к *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Эта же таблица свидетельствует о повторяемости при подсчетах.

Рекомендации

В последний день практикума участники заполнили вопросник с изложением замечаний и рекомендаций. Все они были очень удовлетворены как уровнем организации, так и фактором усвоения множества новых для них научно-технических знаний в течение недели.

Для дальнейших исследований они рекомендовали другие параметры, такие как параметры, связанные с бактериофагами и кишечными вирусами. Они указали на отсутствие греческой методологии для микробиологического анализа морской воды и обратились к факультету с просьбой приложить усилия с тем, чтобы исправить это положение.

Приложение 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Таблица 1. Сводные статистические данные о замерах микробных плотностей: среднее геометрическое, доверительный интервал в 95% для средних значений и диапазона индивидуальных измерений

Методы и среда/ фильтр	№	Среднее геометри- ческое	Доверительный интервал 95%		Диапазон	
Цельные кишеч- ные бактерии						
НВЧ/GL	11	1442	785	–	2651	286 – 4622
НВЧ/LTB	11	1388	710	–	2715	427 – 10 990
МФ	11	1396	1234	–	1579	1000 – 2050
Фекальные кишеч- ные бактерии						
НВЧ/GL	11	955	460	–	1982	147 – 4622
НВЧ/LTB	11	1150	542	–	2437	147 – 4622
МФ/FC	11	1186	967	–	1454	600 – 1850
МФ/LSA	11	1255	1103	–	1429	840 – 1800
<i>E. coli</i>						
НВЧ/GL	11	955	460	–	1982	147 – 4622
НВЧ/LTB	11	1013	446	–	2297	147 – 4622
МФ/FC	9	1256	1103	–	1429	1100 – 1850
МФ/LSA	10	1280	1142	–	1439	1000 – 1800
Энтерококки						
МФ	11	800	663	–	967	500 – 1400
<i>P. aeruginosa</i>						
МФ	10	3000	2379	–	3783	1650 – 4400
<i>S. aureus</i>						
НВЧ	11	21	8,5	–	50	0 – 240
МФ	9	38	10	–	143	3 – 550

Таблица 2. Результаты сравнения сред, фильтров и методов

Микроорганизм	Сравнение между	Статистический тест	Уровень значения
Цельные кишечные бактерии (total coliforms)	НВЧ-среды	Wilcoxon	0,89
	НВЧ и МФ	Friedman	0,98
Фекальные кишечные бактерии	НВЧ-среды	Wilcoxon	0,24
	МФ фильтры	Wilcoxon	0,48
<i>E. coli</i>	НВЧ и МФ	Friedman	0,66
	НВЧ-среды	Wilcoxon	0,74
<i>S. aureus</i>	МФ фильтры	Wilcoxon	0,68
	НВЧ и МФ	Friedman	0,80
		Wilcoxon	0,31

Таблица 3. Значение теста T_1 для разброса двойных замеров наблюдателем

Наблюдатель	Цельные кишечные бактерии	Фекальные кишечные бактерии		<i>E. coli</i>		Энтерококки	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
		FC	LSA	FC	LSA			
1	0,00	0,06	0,05	N/A	N/A	0,23	0,00	0,00
2	0,15	0,33	5,26	0,33	5,26	1,21	7,36	3,20
3	0,36	0,31	1,00	0,31	1,00	0,89	0,53	3,00
4	2,61	2,91	0,00	2,91	0,00	0,00	1,64	0,15
5	2,61	0,44	4,00	0,44	4,00	3,61	37,35	0,00
6	8,80	2,46	0,36	2,46	0,36	0,20	0,24	0,25
7	0,53	0,39	1,81	0,39	0,39	0,00	1,17	0,33
8	0,57	1,32	1,38	1,32	1,38	0,53	1,25	2,86
9	2,46	0,04	0,05	N/A	N/A	1,80	1,28	2,00
10	0,53	0,39	1,96	0,39	1,96	0,11	0,03	0,44
Итого	18,82	8,65	15,87	8,55	14,35	8,58	13,50	12,23
P	0,043	0,57	0,10	0,38	0,07	0,57	0,14	0,27

Примечания: 1. Двойные замеры не были произведены наблюдателем 11.
2. Итоговые данные по *P. aeruginosa* за исключением наблюдателя 5.

Тесты Bonferroni по отдельным наблюдателям:

P. aeruginosa $\chi^2_1 = 37,35$; $P < 0,00001$

$\chi^2_1 = 7,36$; $P = 0,007 \times 9 = 0,063$

Итого по кишечным бактериям: $\chi^2_1 = 8,86$; $P = 0,003 \times 10 = 0,03$

Таблица 4, Сравнение разброса данных у одного наблюдателя и между данными нескольких наблюдателей; результаты ANOVA и предположительная повторяемость

Микроорганизм	Фильтр	Разбавление	Число наблюдателей	P при ANOVA	Повторяемость
Итого по кишечным бактериям		1:100	10	0,87	15,8
Фекальные кишечные бактерии	FC	1:100	8	0,19	10,0
	LSA	1:100	9	0,92	13,6
<i>E. coli</i>	FC	1:100	6	0,51	10,7
	LSA	1:100	8	0,91	13,7
Энтерококки		1:100	6	0,10	6,5
		1:10	5	0,17	26,3
<i>P. aeruginosa</i>		1:100	9	0,019	18,5
<i>S. aureus</i>		1:10	10	< 0,0001	10,8

Примечание: P = уровню статистического значения для изменчивости данных у нескольких наблюдателей по сравнению с данными у одного наблюдателя.