Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды

Методические указания МУК 4.2.671—97

Издание официальное

Минздрав России
Москва•1997

gost.e-ecolog.ru

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды

Методические указания
МУК 4.2.671—97

ББК 51.21
М54

М54 **Методы** санитарно-микробиологического анализа питьевой воды: Методические указания.—М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997.—36 с.

ISBN 5—7508—0095—4

1. Разработаны авторским коллективом в составе: Недачин А. Е., Артемова Т. З., Доскина Т. В., Дмитриева Р. А., Тишкова Н. Ю., Сидоренко С. Г. (НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина Российской Академии Медицинских Наук).

При участии Трухиной Г. М. (Московский НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана Минздрава Российской Федерации); Кашкаровой Г. П., Ахапкиной Е. Н. (Аналитический центр контроля качества воды «Роса»); Кривопаловой Н. С., Воронцовой Г. В., Сорокиной Р. С. (Федеральный центр Государственного санитарно-эпидемиологического надзора), Русановой Н. А. (НИИ коммунального водоснабжения и очистки воды).

2. Утверждены и введены в действие Председателем Госкомсанэпиднадзора России - Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 4 июля 1997 года.

3. Введены впервые к СанПиН 2.1.4.559—96 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

ББК 51.21

ISBN 5—7508—0095—4

©Информационно-издательский
центр Минздрава России

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 5
3. Отбор, хранение и транспортирование проб 5
4. Оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды 7
5. Приготовление питательных сред и реактивов 10
6. Подготовка к анализу 15
7. Методика работы при использовании мембранных фильтров 16
8. Проведение анализа 17
8.1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре 17
8.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации 19
8.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом 23
8.4. Определение споровых сульфитредуцирующих клостридий методом мембранной фильтрации 26
8.5. Определение споровых сульфитредуцирующих клостридий прямым методом 28
8.6. Определение колифагов прямым методом 29
8.7. Определение колифагов титрационным методом 30
Приложение 32

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 июля 1997 г.
МУК 4.2.671—97
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды

Методические указания МУК 4.2.671—97

1. Область применения

Методические указания устанавливают методы микробиологического анализа питьевой воды по нормируемым показателям СанПиН 2.1.4.559—96 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Настоящие методические указания являются обязательными для контроля качества питьевой воды в отношении ее эпидемической безопасности при проведении государственного и производственного контроля, а также сертификационных испытаний, и распространяются на все лаборатории, выполняющие эти исследования, вне зависимости от подчиненности и форм собственности.

Издание официальное

Настоящие методические указания не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России.

2. Нормативные ссылки

В настоящих методических указаниях использованы ссылки на следующие документы:

2.1. СанПиН 2.1.4.559—96 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

2.2. ИСО 9308-1: 1990. Качество воды. Обнаружение и подсчет колиформных организмов, термотолерантных колиформных организмов и предполагаемых E. coli.—часть 1: Метод мембранной фильтрации.

2.3. Обнаружение и подсчет колиформных организмов, термотолерантных колиформных организмов и предполагаемых E. coli.—Часть 2: Титрационный метод (определение наиболее вероятного числа).

2.4. ИСО 6222-1988. Качество воды. Проведение анализа на наличие жизнеспособных микроорганизмов.

2.5. ИСО 6461-2: 1986. Качество воды. Обнаружение и подсчет спор сульфитредуцирующих анаэробов (клостридий).—Часть 2: Метод мембранной фильтрации.

2.6. Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов. Москва, 1981, № 2285—81.

2.7. ГОСТ 18963—73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа.

2.8. Руководство по контролю качества питьевой воды. ВОЗ. Женева 1994. Часть 1.

3. Отбор, хранение и транспортирование проб

3.1. Общие требования к отбору проб

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов.

Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги).

Многоразовая посуда, в том числе пробки, должна выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

Пробу отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил стерильности. Емкость открывают непосредственно

перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду запрещается.

При исследовании воды из распределительных сетей отбор проб из крана производят после предварительной его стерилизации обжиганием и последующего спуска воды не менее 10 минут при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды может быть уменьшен. Пробу отбирают непосредственно из крана без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок.

Если через пробоотборный кран происходит постоянный излив воды, отбор проб производят без предварительного обжига, не изменяя напора воды и существующей конструкции (при наличии силиконовых или резиновых шлангов).

Если отбирают воду после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, вносят до стерилизации натрий серноватистокислый в виде кристаллов или концентрированного раствора из расчета 10 мг на 500 мл воды.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком.

При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании.

При отборе проб в одной и той же точке для различных целей, первыми отбирают пробы для бактериологических исследований.

Отобранную пробу маркируют и сопровождают актом отбора проб воды с указанием места, даты, времени забора и другой информации.

3.2. Хранение и транспортирование проб

К исследованию проб в лаборатории необходимо приступить как можно быстрее с момента отбора.

Доставка проб осуществляется в контейнерах-холодильниках при температуре +4—+10 °С. В холодный период года контейнеры должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При соблюдении указанных условий срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 часов.

Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2-х часов после забора.

Если не может быть соблюдено время доставки пробы и температура хранения, анализ пробы проводить не следует.

Пробы питьевой воды должны доставляться в отдельных продезинфицированных контейнерах.

4. Оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды

4.1. Основное оборудование

Термостат, способный поддерживать рабочую температуру 37 °С и обеспечивать градиент температуры в камере ±1 °С

Термостат, способный поддерживать рабочую температуру 44 °С и обеспечивать градиент температуры в камере ±1 °С

Термостат или водяная баня, способные поддерживать рабочую температуру в камере 44 °С с градиентом температуры в камере ±0,5 °С

Водяная баня, обеспечивающая поддержание рабочего температурного режима 75 °С с градиентом температуры ±5 °С

Водяная баня или термостат, способные поддерживать температуру 45—50 °С (для питательных сред)

Прибор для мембраной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм; вакуумный насос для создания разрежения 0,5—1,0 атм.; прибор вакуумного фильтрования ПВФ-35 и вакуумный насос СП-4-044 отечественного производства

Весы лабораторные общего назначения 4-го класса точности, наибольший предел взвешивания 200 г, допускается погрешность не более 0,02 г

Весы лабораторные общего назначения 4-го класса точности, наибольший предел взвешивания 1 кг, допускается погрешность не более 0,1 г

РН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до 0,01

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже ГОСТа 6709—72

Лупа измерительная 2^x

Шкаф сушильный, стерилизационный, обеспечивающий температуру +180 °С

Стерилизатор паровой с режимами стерилизации от температуры +100 °С (текучим паром) до +126 °С (под давлением)

Холодильник бытовой

Вытяжной шкаф для работы с хлороформом при проведении анализа на колифаги

Магнитные мешалки с подогревом до 300 °С для варки сред, либо другой нагревательный прибор

Дозаторы для разлива питательных сред

Дозаторы пипеточные для использования в анализе.

Примечание: *к применению допускается только измерительное оборудование, вошедшее в Государственный реестр.*

4.2. Мелкое оборудование и расходные материалы

Мембранные фильтры нитрат или ацетат целлюлозные для микробиологических целей с диаметром пор 0,45 мкм и размером 35 или 47 мм: отечественные фильтрующие мембраны Владипор МФАС-ОС-1, МФАС-ОС-2, МФА-МА (номер 4—6); или аналогичные мембраны зарубежного производства, имеющие международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29 000

Горелки газовые или спиртовки

Индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6—8 с интервалом определения 0,2

Петли бактериологические

Пинцеты для работы с мебранными фильтрами

Штативы для пробирок

Фольга алюминиевая, колпачки силиконовые, металлические

Лабораторная посуда стеклянная либо одноразового использования (колбы, цилиндры, пипетки, флаконы, стаканы, чашки Петри, пробирки, стеклянные палочки, поплавки, емкости для отбора проб)

Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием

Бумага фильтровальная

Вата хлопковая

Карандаши или фломастеры по стеклу

Лейкопластырь

Марля медицинская в кусках или бинты

Перчатки резиновые

4.3. Химические реактивы

Все химические реактивы должны соответсвовать квалификации не ниже ч. д. а.

Железо сернокислое закисное	ГОСТ 4148—78
Бромтимоловый синий	
Кислота соляная	ГОСТ 3118—77
Натрий серноватистокислый	ГОСТ 4215—66

Натрий хлористый	ГОСТ 4233—77
Натрий гидрат окиси	ГОСТ4328—77
Спирт этиловый ректификованный 96 %-ный, медицинский	ГОСТ 5962—67
Спирт этиловый технический для обработки столов, термостатов, холодильников и другого инвентаря	ГОСТ 18300—87
Глюкоза	ГОСТ 6038—79
Лактоза	ГОСТ 6038—74
Маннит	ГОСТ 8321—74
Натрий сернистокислый (сульфит натрия)	ГОСТ 903—76
а-нафтол	ГОСТ 5838—79
Розоловая кислота	
Фенилендиаминовые соединения* (тетраметил – п- фенилендиамин гидрохлорид, диметил-п-фенилендиамин солянокис-лый, диметил-п-фенилендиамин, дифенил-п-фенилендиамин и другие)	
Фуксин основной*	ТУ 6—09—4119—75
Хлороформ технический*	ГОСТ 20015—76

Примечание: * *вещества обладают канцерогенным и мутагенным действием, работать с соблюдением мер предосторожности.*

4.4. Питательные среды промышленного производства

Агар Эндо сухой	
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—77
Агар сухой питательный	
Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой	
Сухой препарат с индикатором ВР и маннитом	
Сухой препарат с индикатором ВР и глюкозой	
Сухой питательный бульон	
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76

Системы индикаторные бумажные (СИБ):

- СИБ-лактоза;
- СИБ-маннит;
- СИБ-оксидаза;
- СИБ-глюкоза.

Допускаются к использованию коммерческие питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации производства зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические

препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29 000.

При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Все обезвоженные коммерческие питательные среды и препараты отечественного производства должны иметь сертификат соответствия, паспорт и инструкцию по применению.

4.5. Тест–культуры микроорганизмов

Штамм E. coli K_{12} F^+

Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas fluorescens

Контрольные штаммы получают в Российском Государственном институте медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича или Областном Центре госсанэпиднадзора.

5. Приготовление питательных сред и реактивов

5.1. Общие положения

Предпочтительно использование стандартизованных сухих питательных сред промышленного производства.

При использовании промышленных сухих питательных сред их приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке. В этом случае следует соблюдать способ применения и срок хранения питательных сред, указанных на упаковках.

Сухие питательные среды хранят в сухих помещениях, в темноте, при комнатной температуре. Открытые упаковки тщательно закупоривают. Среды с измененным внешним видом (уплотненные, с комками), а также с истекшим сроком годности не используют.

Для приготовления растворов, реактивов и питательных сред применяют воду дистиллированную по ГОСТу 6709—72.

Питательные среды приготовляют в посуде из инертного материала.

Учитывая возможное изменение pH питательных сред после кипячения и стерилизации при приготовлении сред устанавливают pH на 0,2—0,3 выше заданного, что определяют опытным путем для каждой среды. Окончательный контроль pH проводят в готовой среде при температуре 25 °С с использованием pH-метра (жидкие среды) или бумажных индикаторов (агаризованные среды).

После стерилизации питательные среды оставляют для охлаждения при комнатной температуре.

Температура сред, хранящихся в холодильнике, перед посевом должна быть доведена до комнатной.

При необходимости разлить готовую питательную среду в чашки Петри, ее следует охладить до температуры 50—60 °С.

Готовые полужидкие питательные среды хранят при комнатной температуре.

5.2. Мясная вода

500 г мясного фарша без жира и сухожилий заливают 1 л дистилированной воды, настаивают 12 часов на холоде или 1 час в водяной бане при 50—60 °С. Затем настой кипятят, фильтруют через марлю или вату и опять доводят дистилированной водой до 1 л, разливают во флаконы, стерилизуют при (120±2) °С (10^5 ПА) 20 мин и приступают непосредственно к приготовлению мясо-пептонного бульона или других питательных сред.

5.3. Питательный бульон

5.3.1. Мясо-пептонный бульон (МПБ)

К 1 л мясной воды прибавляют 10 г пептона и 5 г натрия хлористого, нагревают до полного растворения пептона и соли, устанавливают pH (7,2—7,4), осветляют, фильтруют и разливают в пробирки или во флаконы в количествах, необходимых для анализа, закрывают ватными пробками и стерилизуют при (120±2) °С (10^5 ПА) 20 мин.

5.3.2. Питательный бульон из заменителей мяса (ПБ)

Готовят из заменителей мяса (мясного экстракта, рыбного гидролизата или других) по способу, указанному на этикетке.

Для приготовления десятикратного питательного бульона количество пептона и хлористого натрия (п. 5.3.1) или сухого препарата (п. 5.3.2) увеличивают в 10 раз.

5.4 Питательный агар

5.4.1. Питательный агар промышленного производства

Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке.

5.4.2. Мясо-пептонный агар (МПА)

1,5 % МПА – к 1 л мясо-пептонного бульона прибавляют 15 г агара в волокнах или порошке, нагревают до полного растворения, корректируют pH (7,2—7,4), осветляют, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр и разливают во флаконы или пробирки в количествах, необходимых для анализа. Стерилизуют при (120±2) °С (10^5 ПА) 20 минут.

2 % МПА готовят, увеличивая концентрацию агара до 20 г на тот же объем МПБ.

5.4.3. Питательный агар на основе (ПБ) из заменителей мяса

Готовят по п. 5.4.2, заменяя мясо-пептонный бульон на питательный бульон из заменителей мяса.

2 %-ный питательный агар готовят, увеличивая навеску сухого препарата на 1/4 от прописи.

5.5. Фуксин – сульфитная среда Эндо

5.5.1. Основная модификация

Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке.

Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60—70 °С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды 0,2 мл 5 %-ного спиртового раствора основного фуксина.

Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить. Срок хранения чашек со средой не более 2—3 суток в темноте, раствора фуксина – не более 1-го месяца.

5.5.2. Модификация среды с добавлением розоловой кислоты

При исследовании питьевой обеззараженной воды с преобладанием микрофлоры, не относящейся к бактериям кишечной группы, помимо фуксина, допускается добавление на 100 мл среды Эндо 0,2 мл 5 %-го спиртового раствора розоловой кислоты. Срок хранения розоловой кислоты – не более 1-го месяца.

5.6. Лактозо–пептонная (глюкозо–пептонная) среда

10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы (глюкозы) растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают pH (7,4—7,6),

разливают по 10 мл в пробирки, стерилизуют при (112±2) °С ($5,10^4$ ПА) 12 минут.

Для приговления концентрированной лактозо-пептонной (глюкозо-пептонной) среды все ингредиенты, кроме воды, увеличивают в 10 раз, разливают по 1 мл в пробирки и по 10 мл во флаконы.

5.7. Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу или маннит (глюкозу) до кислоты и газа

5.7.1. Полужидкая среда с лактозой или маннитом (глюкозой)

Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. Срок хранения – не более 2-х недель.

5.7.2. Полужидкая среда с лактозой или маннитом (глюкозой)

Готовят при отсутствии сухого препарата.

В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4—5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают pH (7,2—7,4), добавляют 1 мл 1,6 % спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при (120±2) °С (10^5 ПА) 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы или маннита (глюкозы), нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3—5 см и стерилизуют при (112±2) °С ($5,10^4$ ПА) 12 мин. Срок хранения – не более 2-х недель.

Правильно приготовленная среда – зеленого цвета с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла). Посев производят уколом до дна пробирки. При образовании кислоты цвет среды изменяется в желтый, при газообразовании газ скапливается или по уколу, или на поверхности, или в толще среды появляются разрывы. При инкубации посевов более 5 часов газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды «карманы» – потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.

5.7.3. Лактозо-пептонная среда по п. 5.6

При использовании в качестве подтверждающей следует добавить 2 мл 1,6 %-ного неспиртового раствора индикатора бромтимолового синего на 1000 мл среды.

---

*Глюкозу используют при отсутствии маннита.

Разливают по 4—5 мл в пробирки с поплавками или комочками ваты.

5.7.4. СИБ-лактоза или СИБ-маннит (глюкоза)

Готовят по прописи завода-изготовителя.

5.8. Реактивы для оксидазного теста

1 вариант - 1 %-ный водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида.

2 вариант - 1 %-ный реактив - 1 %-ный спиртовой раствор а-нафтола, 2-ой реактив - 1 %-ный водный раствор фенилендиаминового соединения.

Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: 1-ый - до одного месяца, 2-ой - до одной недели. Перед употреблением (при работе со 2 вариантом) к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора.

Вместо реактива можно использовать системы индикаторные бумажные (СИБ-оксидаза) или бумажки, приготовленные заранее.

Приготовление бумажек для оксидазного теста: 30 мг а-нафтола растворить в 2,5 мл 96 %-ного этилового спирта, добавить 7,5 мл дистиллированной воды и затем 50 мг диэтиланилинсульфата. Смочить фильтровальную бумажку, высушить и хранить в темноте в черной бумаге не более 6 месяцев.

С каждой новой партией реактивов, а также периодически в процессе хранения реактивов или готовой бумажной системы следует проводить контрольные испытания с тест-культурами известных микроорганизмов, дающих положительную реакцию (Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas fluorescens) и отрицательную реакцию (E. coli).

5.9. Железо-сульфитный агар

Основная среда. В 1000 мл стерильного расплавленного питательного агара (по п. 5.4) добавляют 10 г глюкозы, нагревают до растворения, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при (112±2) °С 12 минут.

20 %-ный раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) и 8 %-ный раствор железа сернокислого закисного (Fe_2SO_4) готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия

нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20 %-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8 %-ного раствора сернокислого железа, перемешивают и разливают с соблюдением правил стерильности в стерильные пробирки высоким столбиком (12—15 см) – для работы методом мембранной фильтрации, или во флаконы – для работы методом прямого посева.

6. Подготовка к анализу

6.1. Подготовка посуды и материалов

Лабораторная посуда должна быть тщательно вымыта, ополоснута дистиллированной водой до полного удаления моющих средств и других посторонних примесей и высушена.

Пробирки, колбы, бутылки, флаконы должны быть заткнуты силиконовыми или ватно-марлевыми пробками и упакованы так, чтобы исключить загрязнения после стерилизации в процессе работы и хранения. Колпачки могут быть металлические, силиконовые, из фольги или плотной бумаги.

Флаконы для отбора проб закрывают силиконовыми, резиновыми и другими пробками, исключая ватно-марлевые, а также колпачками, изготовленными из фольги, плотной бумаги и др.

Новые резиновые пробки кипятят в 2 %-ном растворе натрия двууглекислого 30 мин и 5 раз промывают водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят в дистиллированной воде 30 мин, высушивают, заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют в паровом стерилизаторе. Резиновые пробки, использованные ранее, обеззараживают, кипятят 30 минут в водопроводной воде с нейтральным моющим средством, промывают в водопроводной воде, высушивают, монтируют и стерилизуют.

При приготовлении емкостей для отбора проб с притертой пробкой, между стенкой горлышка и пробкой следует вложить полоску тонкой бумаги.

Пипетки со вставленными тампонами из ваты должны быть уложены в металлические пеналы или завернуты в бумагу.

Чашки бактериологические в закрытом состоянии должны быть уложены в металлические пеналы или завернуты в бумагу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации.

Подготовленную посуду стерилизуют в сушильном шкафу при 160—170 °С 1 час, считая с момента достижения указанной температуры. Простерилизованную посуду можно вынимать из сушильного шкафа только после его охлаждения ниже 60 °С.

Материалы и лабораторная посуда, имеющие элементы материалов, разрушающихся при температуре 160 °С (резина и т. п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре (121±2) °С (10^5 ПА) 20 мин.

После выполнения анализа все использованные чашки и пробирки обеззараживают в автоклаве при (126±2) °С 60 мин. Пипетки обеззараживают кипячением в 2 %-ном растворе $NaHCO_3$.

После охлаждения удаляют остатки сред, затем чашки и пробирки замачивают, кипятят в водопроводной воде и моют с последующим ополаскиванием дистиллированной водой.

6.2. Подготовка проб воды

Прежде чем приступить к посеву, пробу необходимо тщательно перемешать и обработать горящим тампоном край емкости с тем, чтобы устранить его возможное загрязнение во время транспортирования. На используемых для посева пробирках и чашках необходимо обозначить номер пробы, объем воды или разбавление, дату посева.

Перед каждым отбором новой порции воды для анализа пробу необходимо перемешать стерильной пипеткой.

7. Методика работы при использовании мембранных фильтров

7.1. Подготовка мембранных фильтров

Мембранные фильтры должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями завода-изготовителя.

7.2. Подготовка фильтровального аппарата

Фильтровальный аппарат обтирают ватным тампоном, смоченным спиртом ректификованным, и фламбируют. После охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют устройством, предусмотренным конструкцией прибора.

7.3. Фильтрование воды

В верхнюю часть прибора для фильтрования наливают точно отмеренный объем воды, затем создают вакуум в нижней части прибора.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат сначала меньшие, а затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры.

При фильтровании 1 мл исследуемой воды или ее разбавления следует в воронку налить предварительно не менее 10 мл стерильной водопроводной воды, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования воронку снимают, фильтр осторожно приподнимают за край фламбированным пинцетом при сохранении вакуума для удаления излишка воды на нижней стороне фильтра, а затем переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с оседавшими на ней бактериями должна быть обращена вверх. Вакуум отключают до внесения следующей порции анализируемой воды.

Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева и номера пробы. На одну чашку можно поместить 3—4 фильтра с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

Если исследуемая вода содержит большое количество взвешенных веществ, то ее фильтруют сначала через предварительный мембранный фильтр для удаления крупной взвеси, который помещают в фильтровальный прибор, накладывая на фильтр для бактериологического анализа. После окончания фильтрования фильтры переносят на плотную питательную среду раздельно и при выведении результатов анализа учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

8. Проведение анализа

8.1 Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре

8.1.1. Определение понятия показателя

Метод определяет в питьевой воде общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37 °С в течение 24 часов, видимые с увеличением в 2 раза.

8.1.2. Выполнение анализа

Из каждой пробы должен быть сделан посев не менее двух объемов по 1 мл.

После тщательного перемешивания пробы воды вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Сразу же после внесения воды в каждую чашку вливают 6—8 мл (на чашку диаметром 90—100 мм) расплавленного и остуженного до 45—46 °С питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

Расплавленный агар на период проведения анализа помещают в водяную баню или термостат, поддерживающие температуру 45—46 °С.

Тонкий слой агара увеличивает эффективность учета сапрофитной микрофлоры за счет лучших условий для роста аэробных бактерий, преобладающих в воде. Колонии вырастают более крупными, легко подсчитываемыми на фоне прозрачного тонкого слоя агара. Ограничен рост расплывчатых колоний.

После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24±2 часов.

8.1.3. Вычисление и представление результатов

Должны быть подсчитаны все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Подсчет следует производить только на тех чашках, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

Подсчитанное количество колоний на каждой чашке суммируют и делят на два. Результат выражают числом колоний образуюших единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды и заносят в протокол.

Результат дают на основании подсчета колоний на одной чашке, если на другой подсчет невозможен.

Если на всех чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющийся на всю поверхность чашки, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают сектор чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечают «число КОЕ в 1 мл – ориентировочно».

Если подсчет колоний на чашках невозможен, то в протоколе отмечают: «сливной рост».

На качество результата метода влияет соблюдение деталей техники анализа (срока хранения пробы, температуры и времени инкубации посевов, правил учета результатов, качество питательного агара).

8.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации

8.2.1. Определение понятия показателя

К общим колиформным бактериям относятся грамотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24-х часов.

Термотолерантные колиформные бактерии обладают всеми признаками общих колиформных бактерий, которые кроме того способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24-х часов.

8.2.2. Принцип метода

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на селективной питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

8.2.3. Выполнение анализа

При исследовании воды на выходе с водопроводных сооружений и в распределительной сети необходимо анализировать 3 объема по 100 мл.

Если анализируемая вода стабильно соответствует нормативам, то допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр.

При необходимости возможно увеличение количества фильтруемых объемов для получения изолированных колоний на фильтре (например, из водопроводной сети можно фильтровать 10, 40, 100, 150 мл воды).

Необходимый точно отмеренный объем воды фильтруют через мембранные фильтры с соблюдением требований, изложенных в п. 7.

Фильтры помещают на среду Эндо, приготовленную по п. 5.5.1 или п. 5.5.2. Чашки с фильтрами ставят в термостат

дном вверх и инкубируют посевы при температуре (37±1) °С в течении 24±2 часов.

8.2.4. Учет результатов

Результат считается отрицательным, если на фильтрах вообще не выросли колонии, или выросли колонии с неровными краями и поверхностью (пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, слизистые).

При сливном росте на всех фильтрах проводят рассев на среде Эндо для получения изолированных колоний обычными бактериологическими методами.

При наличии типичных лактозоположительных колоний, дающих отпечаток на обратной стороне мембранного фильтра и среде – темно-красных, красных с металлическим блеском и без него, выпуклых с красным центром и других оттенков, а также лактозоотрицательных – розовых без отпечатков, подсчитывают число колоний каждого типа.

Для идентификации отбирают не менее 5 колоний каждого вида, делают их посев на скошенный питательный агар, либо на чашки секторами, инкубируют при температуре (37±1) °С 16—18 часов. При росте колоний одного вида исследуют не менее 10 колоний.

Все дальнейшие биохимические тесты проводят только с чистыми субкультурами.

В качестве подтверждающих тестов используют оксидазный тест и тест образования кислоты и газа при ферментации лактозы или маннита (глюкозы).

Для определения оксидазной активности поместить на фильтровальную бумагу 2—3 капли свеже приготовленного реактива для оксидазного теста п. 5.8. Заранее приготовленные бумажки для оксидазного теста смачивают дистиллированной водой. Стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая петля может дать ложно положительную реакцию) помещают мазок свежей культуры, выращенной на питательной агаровой среде, на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 10—30 секунд появляется фиолетово-коричневое (п. 5.8, вариант 1) или синее (п. 5.8, вариант 2) окрашивание. Более позднюю реакцию не учитывают.

При посеве секторами оксидазный тест допустимо выполнить, накапливанием реактива на часть сектора.

В тех случаях, когда на фильтрах выросло более 10 колоний, допустимо оксидазный тест выполнить, помещая мембранный

фильтр на кружок фильтровальной бумаги, обильно смоченный реактивом. После проявления положительной реакции, но не позднее 5 мин, фильтр переносят обратно на среду Эндо и при необходимости дальнейшей идентификации немедленно делают пересев на подверждающую среду.

Культуры, давшие оксидазоположительные реакции, дальнейшему исследованию не подлежат.

Все типичные лактозоположительные колонии засевают параллельно в две пробирки с одной из лактозных сред, приготовленных по п. 5.7. Для определения общих колиформных бактерий посев инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24±2 часов. Для определения термотолерантных бактерий посев производят в среду, предварительно прогретую до температуры 44 °С, и инкубируют при температуре (44±0,5) °С в течение 24±2 часов.

Нетипичные колонии (лактозоотрицательные) пересевают в подтверждающем тесте со средой с маннитом (глюкозой) по п. 5.7 и инкубируют посевы при температуре (37±1) °С в течение 24±2 часов.

Для ускорения анализа допустимо производить посев в подтверждающие среды с лактозой или маннитом непосредственно из колоний на фильтрах параллельно с посевом на скошенный агар (при росте крупных изолированных колоний).

Первичный учет газообразования на подтверждающих средах осуществляют через 5—6 часов. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки оставляют для окончательного учета через 24 часа.

При необходимости, если отсутствует газообразование в пробирках с лактозой, допустимо, для подтверждения принадлежности колоний к общим колиформным бактериям, сделать пересев в среду с маннитом (глюкозой), инкубируя посевы при температуре (37±1) °С в течение 24±2 часов.

Колонии учитывают как **общие колиформные бактерии** при отрицательном оксидазном тесте, ферментации лактозы или маннита (глюкозы) при температуре (37±1) °С с образованием кислоты и газа.

Среди этих колний учитывают как **термотолерантные колиформные бактерии** *при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре (44±0,5) °С с образованием кислоты и газа.*

Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то для вычисления числа колиформных бактерий среди этих колоний используют формулу:

$$X = \frac{(a \cdot c)}{b}, \text{ где}$$

X – число колоний одного типа;
a – общее число колоний этого типа;
b – число проверенных из них;
c – число колоний с положительным результатом.

8.2.5. Вычисление и представление результатов

Результат анализа выражают числом колоний образующих единиц (КОЕ) общих колиформных бактерий в 100 мл воды.

Для подсчета результата суммируют число колоний, подтвержденных как общие колиформные бактерии, выросших на всех фильтрах, и делят на 3.

При получении изолированных колоний после рассева заросших фильтров и подтверждения их как общие колиформные бактерии результат является качественным, в протоколе отмечают «обнаружено». При необходимости получения количественного результата анализ следует повторить.

В случаях сплошного роста на всех фильтрах и невозможности получения изолированных колоний результат не учитывается. В протоколе отмечают «зарост фильтров».

Примеры:

1. При посеве 3-х фильтров по 100 мл выросло две колонии на 100 мл, на остальных 2-х фильтрах нет роста. Число общих колиформных бактерий будет

2 : 3 = 0,7КОЕ в 100 мл.

2. При посеве 10, 40, 100 и 150 мл на фильтрах с профильтрованным объемом 40 мл выросли 4 изолированные колонии, с профильтрованным объемом 100 – 3 колонии общих колиформных бактерий. Фильтры с объемами 10 мл и 150 мл заросли и учету не подлежат. Суммируют общее число изолированных колоний и пересчитывают на объем 100 мл. В данном случае суммарное число изолированных колоний равно 7 (3 + 4 = 7) в объеме 140 мл (100 + 40). Число КОЕ будет составлять (7 х 100) : 140 = 5 КОЕ в 100 мл.

При отсутствии общих колиформных бактерий на всех фильтрах результат записывают как «не обнаружено КОЕ в 100 мл».

Вычисление и оформление результатов в протоколе определения термотолерантных колиформных бактерий проводят аналогично.

8.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

8.3.1. Область применения и определение понятия показателя

К общим колиформным бактериям относятся грамотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу или маннит с образованием альдегида, кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 24—48 часов.

Определение понятия термотолерантных колиформных бактерий по п. 8.2.1.

Титрационный метод может быть использован:

- при отсутствии материлов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации;
- при анализе воды с большим содержанием взвешенных веществ;
- в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиформных бактерий.

8.3.2. Принцип метода

Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду, с последующим пересевом на селективную плотную питательную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

8.3.3. Выполнение анализа

При исследовании питьевой воды централизованного водоснабжения засевают 3 объема по 100 мл (анализ качественный). При исследованиях воды с целью количественного определения общих колиформных бактерий и при повторном анализе производят посев: 3 объемов по 100 мл, 3 объемов по 10 мл, 3 объемов по 1 мл. Каждый объем исследуемой воды засевают в лактозо-пептонную среду, приготовленную по п. 5.6. Посев 100 мл и 10 мл воды производят в 10 и 1 мл концентрированной лактозо-пептонной среды, посев 1 мл пробы проводят в 10 мл среды обычной концентрации.

Посевы инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24—48 часов. После 24 часов инкубации проводят предварительную оценку посевов. Из емкостей, где отмечено наличие роста и образование газа, производят высев на сектора среды Эндо, приготовленной с добавлением фуксина (п. 5.5.1). Посев делают петлей с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии.

Засеянные емкости без наличия роста и образования газа оставляют при (37±1) °С до 48 часов. После 48 часов инкубации посевы без признаков роста считают отрицательными и дальнейшему исследованию не подлежат. Из емкостей, где отмечено помутнение и образование газа или только помутнение, делают высев на сектора среды Эндо.

Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 18—20 часов.

Допустимо в качестве среды накопления использовать глюкозо-пептонную среду вместо лактозо-пептонной. В этом случае высев на сектора среды Эндо производят через 24 часа инкубации из посевов, где отмечено помутнение и газообразование или только помутнение. Дальнейший анализ выполняют так же, как и при использовании лактозо-пептонной среды.

8.3.4. Учет результатов

При образовании помутнения и газа в среде накопления и росте на среде Эндо типичных для лактозоположительных бактерий колоний, дающих отпечаток на среде, образующих альдегид – темно-красных или красных, с металлическим блеском или без него, выпуклых с красным центром, дают положительный ответ на присутствие общих колиформных бактерий в данном объеме пробы.

В следующих случаях требуется подтвердить наличие общих колиформных бактерий:

- если в среде накопления отмечено только помутнение (подтвержают на среде с маннитом /глюкозой/);
- когда принадлежность к лактозоположительным колониям вызывает сомнение у исследователя, подтверждают на среде с лактозой.

При этом проверяют наличие отпечатка на среде Эндо после снятия петлей подозрительной колонии. Среда под лактозоположительной колонией окрашена в красный цвет. Выполняют оксидазный тест на чистой агаровой субкультуре, как это описано в п. 8.2.4, после посева этих колоний на скошенный агар или сектор чашки с питательным агаром. Подтверждают способность к газообразованию при посеве изолированных 1—2-х колоний с сектора на среду с лактозой или маннитом (глюкозой) по п. 5.7 (в зависимости от цели исследования) с последующей инкубацией посевов при температуре (37±1) °С в течение 24-х часов.

Если на секторе получено наслоение культур, то необходимо произвести рассев подозрительных на типичные колонии общепринятыми бактериологическими методами.

Дальнейшему исследованию подлежат также сектора среды Эндо, где выросли лактозоотрицательные розовые колонии. Для идентификации выполняют оксидазный тест путем накапывания реактива на часть колоний, выросших на секторе. После обнаружения оксидазоотрицательных колоний, 2—3 из них каждого типа и с каждого сектора пересевают на подтверждающие среды с маннитом (глюкозой) по п. 5.7 и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24-х часов.

Первичный учет газообразования осуществляют через 5—6 часов. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки оставляют для окончательного учета через 24 часа. Положительный ответ на наличие общих колиформных бактерий дают при ферментации лактозы или маннита (глюкозы) до кислоты и газа хотя бы одной колонией с сектора.

Отрицательный ответ дают, если:

- в среде накопления нет признаков роста;
- на секторах среды Эндо нет роста;
- на секторах среды Эндо выросли не характерные для колиформных бактерий колонии (прозрачные, с неровными краями, расплывчатые и т. п.);
- все колонии на секторе оказались оксидазоположительными;
- если в подтверждающем тесте на среде с лактозой или маннитом (глюкозой) не отмечено газообразования.

Для определения **термотолерантных колиформных бактерий** работают с секторами среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии и отмечено помутнение и газообразование в среде накопления. Делают посев 2—3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с любой из лактозных сред, приготовленных по п. 5.7.

Среда перед посевом должна быть нагрета на водяной бане или в термостате до 44 °С. Немедленно после посева пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре (44±0,5) °С в течение 24±2 часов.

При образовании газа в среде накопления, росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий, образующих альдегид, и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24-х часов при температуре 44 °С дают положительный ответ на наличие в этом объеме пробы

воды термотолерантных колиформных бактерий. Во всех остальных случаях дают отрицательный ответ.

Допустимо для ускорения выдачи ответа на присутствие термотолерантных колиформных бактерий производить высев 1 мл из объемов среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование, в пробирки с лактозо-пептонной средой с поплавком по п. 5.7 и прогретой предварительно до температуры 44 °С. Посевы выдерживают в термостате при температуре (44±0,5) °С в течение 24±2 часов. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

8.3.5. Вычисление и представление результатов

При исследовании 3-х объемов по 100 мл результаты оцениваются качественно, и при обнаружении общих или термотолерантных колиформных бактерий хотя бы в одном из трех объемов, делают запись в протоколе «обнаружены» в 100 мл.

При исследовании количественным методом, после определения положительных и отрицательных результатов на наличие общих и термотолерантных колиформных бактерий в объемах воды, посеянных в среду накопления, вычисляют наиболее вероятное число бактерий в 100 мл пробы по табл. 1. Результат сообщают без доверительного интервала.

При отрицательном ответе на наличие общих или термотолерантных колиформных бактерий во всех исследованных объемах выдают заключение в протоколе «не обнаружены» в 100 мл.

8.4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий методом мембранной фильтрации

8.4.1. Определение показателя

Сульфитредуцирующие клостридии, преимущественно Clostridium perfringens, – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре при температуре 44 °С в течение 24-х часов.

8.4.2. Принцип метода

Метод основан на фильтрации исследуемого объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов в железо-сульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа черных колоний.

8.4.3. Выполнение анализа

Пробу воды 20 мл прогревают на водяной бане в пробирках при температуре (75±5) °С в течение 15 минут для исключения вегетативных форм.

Из каждой пробы питьевой воды на выходе с водопроводных сооружений фильтруют 20 мл. При необходимости подбирают объемы с таким расчетом, чтобы на фильтрах выросло не более 10—15 колоний. При этом ориентируются на результаты *предыдущих исследований*.

Фильтрование воды производят в соответствии с требованиями, изложенными в п. 7.

Вариант 1 – определение в пробирках.

Перед посевом пробирки с железо-сульфитным агаром, приготовленным по п. 5.9, расплавляют на водяной бане (не кипятить!). В течение посева поддерживают среду нагретой до 70—80 °С в водяной бане желательно с автоматическим регулированием температуры.

После фильтрации установленного объема воды мембранный фильтр фламбированным пинцетом берут за два противоположных края и согнутый в виде трубочки помещают в пробирку с горячим агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки.

Сразу же после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охлаждают, помещая в емкость с холодной водой. Культивируют посевы при (44±1) °С в течение 24±2 часов.

Вариант 2 – определение в чашках Петри.

Чашки Петри диаметром 55—60 мм заливают тонким слоем железо-сульфитного агара. После фильтрации фильтр помещают фильтрующей поверхностью вниз на застывшую питательную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Заливают расплавленым железо-сульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий. Культивируют посевы при (44±1) °С в течение 24±2 часов.

Недопустимо на чашку помещать более одного фильтра.

8.4.4. Учет результатов

Подсчитывают черные колонии. Учету подлежат только те посевы, где получены изолированные колонии, как выросшие на фильтрах, так и в толще среды. Предварительный учет

результатов проводят через 16—18 часов инкубации. Окончательный учет результатов осуществляют через 24 часа.

8.4.5. Вычисление и представление результата

Результат анализа выражают числом колоний образующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды.

Если не отмечен рост черных колоний на всех фильтрах в протоколе анализа дают ответ «не обнаружено» в 20 мл воды.

При наличии колоний, после их подсчета, результат вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a \cdot 20)}{V}, \text{ где}$$

X – число клостридий в 20 мл;

a – число подсчитанных колоний в сумме;

V – фактически профильтрованный объем на фильтрах, где велся учет колоний.

При невозможности учета колоний из-за сливного роста результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено» в 20мл. При необходимости получения количественного результата анализ необходимо повторить.

8.5. Определение споровых сульфитредуцирующих клостридий прямым посевом

8.5.1. Определения показателя

Определение понятия показателя по п. 8.6.1.

8.5.2. Принцип метода

Метод основан на посеве установленного объема воды в пробирки с железо-сульфитным агаром, инкубации посевов при температуре 44 °С в течение 24-х часов и подсчете черных колоний.

8.5.3. Выполнение анализа

Железо-сульфитный агар во флаконах и пробу воды готовят, как это описано в п. 8.4.3.

Из каждой пробы делают посев 20 мл в железо-сульфитной агар, приготовленный по п. 5.9.

В стерильные пробирки вносят:

• по 10 мл в 2 пробирки при использовании пробирок, вмещающих не менее 30 мл;

• по 5 мл воды в 4 пробирки при использовании пробирок, вмещающих не менее 15 мл.

Посевы заливают горячим 75–80 °С железо-сульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливать по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирку быстро охлаждают, помещая ее в емкость с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при (44±1) °С в течение 24±2 часов.

8.5.4. Учет результатов

Учет результатов выполняют по п. 8.4.4.

8.5.5. Вычисление и представление результатов

Подсчет и представление результатов выполняют по п. 8.4.5.

8.6. Определение колифагов прямым методом

8.6.1. Область применения и определение понятия показателя

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса (бляшки) через 18±2 часа при температуре (37±1) °С на ее газоне на питательном агаре. Колифаги – индикаторы очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

Прямой метод выделения колифагов из воды целесообразно применять при проведении исследований по эпидпоказаниям или в случае необходимости получения быстрого результата анализа.

8.6.2. Принцип метода

Принцип прямого метода определения колифагов в питьевой воде заключается в исследовании нормируемого объема воды (100 мл) путем его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на газоне E. coli в чашках Петри с питательным агаром. Для контроля используют чашку с чистым газоном E. coli на питательном агаре. Нижний предел определения колифагов – 1 БОЕ (бляшкообразующая единица) в 100 мл воды.

8.6.3. Проведение анализа

Накануне проведения анализа необходимо сделать посев E. coli на косяк с питательным агаром (п. 5.4).

Перед проведением анализа сделать смыв бактерий с этого косяка 5 мл стерильной водопроводной воды и по стандарту мутности приготовить взвесь E. coli в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл.

Расплавить и остудить до 45 °С 2 %-ный питательный агар (по п. 5.4). Исследуемую воду 100 мл внести в 5 стерильных чашек Петри по 20 мл в каждую. В питательный агар добавить смыв E. coli из расчета 1,5 мл смыва бактерий (в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл) на 150 мл агара и осторожно перемешать. Полученной смесью по 30 мл залить сначала пустую чашку Петри (контроль газона E. coli), а затем все чашки, содержащие исследуемую воду. Содержимое чашек осторожно перемешать. Чашки оставить при комнатной температуре для застывания на 30 минут и затем дном вверх поместить в термостат для инкубирования при температуре (37±1) °С.

Если агар застыл не полностью, чашки Петри следует инкубировать в термостате не переворачивая.

8.6.4. Учет результатов

Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5-ти чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке бляшки колифагов должны отсутствовать.

При наличии бляшек в контрольной чашке следует получить новый штамм E. coli из бактериологической лаборатории Областного центра госсанэпиднадзора и анализ повторить.

8.7. Определение колифагов титрационным методом

8.7.1. Область применения

Метод предназначен для проведения текущего анализа питьевой воды.

8.7.2. Принцип метода

Принцип метода определения колифагов в питьевой воде титрационным методом заключается в предварительном подращивании колифагов в среде обогащения в присутствии E. coli и последующим выявлении бляшек колифага на газоне E. coli на питательном агаре.

Определение НВЧ колифагов производят по табл. 3.

8.7.3. Проведение анализа

Накануне проведения анализа необходимо сделать посев E. coli на косяк с питательным агаром (п. 5.4). Перед анализом произвести смыв бактерий с этого косяка 5 мл стерильной водопроводной воды и по стандарту мутности приготовить взвесь E. coli в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл.

Исследуемые 100 мл пробы воды стерильно разлить по следующим объемам: 50 мл в колбу и по 10 мл в 5 пробирок. В колбу добавить 5 мл, в пробирки по 1 мл десятикратного питательного бульона по п. 5.3. В каждую емкость внести смыв бактерий E. coli в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл: в колбу – 0,5 мл, в пробирки – по 0,1 мл, закрыть ватно-марлевыми пробками и инкубировать в термостате при температуре (37±1) °С.

Сделать посев E. coli на косяк с питательным агаром (по п. 5.4) и инкубировать в термостате при температуре (37±1) °С.

Через 18±2 часа инкубации пробы извлечь из термостата. Из колбы с 50 мл пробы воды стерильно отлить в пробирку 10 мл. Эту пробирку и остальные 5 пробирок промаркировать, в каждую добавить по 1 мл хлороформа, заменить ватно-марлевые пробки на резиновые, пробирки тщательно встряхнуть и оставить при комнатной температуре на 15 минут для осаждения хлороформа.

В предварительно расплавленный и остуженный до 45 °С питательный агар добавить смыв бактерий E. coli в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл из расчета 1,5 мл смыва на 150 мл агара. Эту смесь внести по 25 мл в чашки Петри (1 чашка для исследуемой пробы и 1 чашка для контроля E. coli). После застывания агара чашки подсушить в термостате при температуре (37±1) °С в течение 30 минут.

После этого чашку с агаром для исследуемой пробы разделить на 6 секторов, промаркировать их в соответствии с исследуемыми объемами и в каждый сектор внести по 1 капле надосадочной жидкости (без хлороформа) из каждой пробирки.

После подсыхания капель чашку с исследуемой пробой и контрольную чашку поместить в термостат при (37±1) °С на 18±2 часа.

При одновременном анализе нескольких проб воды контролем газона E. coli может служить одна чашка.

8.7.4. Учет результатов

Учет результатов проводится по наличию на секторах выросших бляшек колифага. Индекс колифага определяется по таблице НВЧ (табл. 3). На контрольной чашке бляшки колифага должны отсутствовать. При обнаружении бляшек колифага на контрольной чашке следует поступить как в п. 8.6.4.

Приложение

Таблица 1

Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 100 мл питьевой воды централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Число положительных результатов			НВЧ бактерий в 100 мл	95 % Доверительный интервал	
3-х объемов по 100 мл	3-х объемов по 10 мл	3-х объемов по 1 мл		нижний	верхний
0	0	1	0,3	0	1,4
0	0	2	0,6x	0,1	2,8
0	0	3	0,9x	0,2	4,2
0	1	0	0,3	0,1	1,4
0	1	1	0,6x	1,1	2,8
0	1	2	0,9x	1,2	4,3
0	1	3	1,2x	0,3	5,7
0	2	0	0,6x	0,1	2,8
0	2	1	0,9x	0,2	4,3
0	2	2	1,2x	0,3	5,8
0	2	3	1,6	0,3	7,3
0	3	0	0,9x	0,2	4,4
0	3	1	1,3x	0,3	5,9
0	3	2	1,6x	0,3	7,4
0	3	3	1,9x	0,4	8,9
1	0	0	0,4	0,1	1,7
1	0	0	0,7	0,2	3,4
1	0	2	1,1x	0,2	5,0
1	0	3	1,5x	0,3	6,9
1	1	0	0,7	0,2	3,4
1	1	1	1,1	0,2	5,2
1	1	2	1,5x	0,3	7,1
1	1	3	1,9x	0,4	8,9
1	2	0	1,1	0,2	5,3
1	2	1	1,5x	0,3	7,1
1	2	2	2,0x	0,4	9,0

Продолжение таблицы 1

Число положительных результатов			НВЧ бактерий в 100 мл	95 % Доверительный интервал	
3-х объемов по 100 мл	3-х объемов по 10 мл	3-х объемов по 1 мл		нижний	верхний
1	2	3	2,4х	0,5	11,1
1	3	0	1,6х	0,3	7,3
1	3	1	2,0х	0,4	9,3
1	3	2	2,4х	0,5	11,3
1	3	3	2,9х	0,6	13,4
2	0	0	0,9	0,2	4,3
2	0	1	1,4	0,3	6,7
2	0	2	2,0х	0,4	9,3
2	0	3	2,6х	0,6	12,1
2	1	0	1,5	0,3	6,9
2	1	1	2,0	0,4	9,6
2	1	2	2,7х	0,6	12,5
2	1	3	3,4х	0,7	15,7
2	2	0	2,1	0,5	9,9
2	2	1	2,8	0,6	12,9
2	2	2	3,5х	0,7	16,3
2	2	3	4,2х	0,9	19,8
2	3	0	2,9	0,6	13,3
2	3	1	3,6х	0,8	16,8
2	3	2	4,4х	0,9	20,6
2	3	3	5,3х	1,1	24,6
3	0	0	2,3	0,5	10,8
3	0	1	3,9	0,8	18,0
3	0	2	6,4	1,4	29,7
3	0	3	9,5х	2,0	44,6
3	1	0	4,3	0,9	20,0
3	1	1	7,5	1,6	35,0
3	1	2	12	2,5	53,8

Продолжение таблицы 1

Число положительных результатов			НВЧ бактерий в 100 мл	95 % Доверительный интервал	
3-х объемов по 100 мл	3-х объемов по 10 мл	3-х объемов по 1 мл		нижний	верхний
3	1	3	16x	3,4	74,2
3	2	0	9	2,0	43,6
3	2	1	15	3,2	69,8
3	2	2	21	4,6	100,3
3	2	3	29	6,2	136,4
3	3	0	24	5,1	112,1
3	3	1	46	9,3	216,0
3	3	2	110	23,5	516,6
3	3	3	более или равно 240	–	–

x – вероятность ниже допустимого уровня.

Таблица 2

Расчет числа бактерий в 100 мл при исследовании воды по этапам очистки

Объем исследуемой воды в мл				НВЧ бактерий в 100 мл
100	10	1,0	0,1	
–	–	–	–	менее 1
–	–	+	–	1
–	+	–	–	1
+	+	–	–	2
+	–	+	–	9
+	+	–	–	23
+	+	–	+	96

Таблица 3

Наиболее вероятное число (НВЧ) в 100 мл

Число положительных результатов		НВЧ бактерий в 100 мл	Вероятность	Нижний предел	Верхний предел
1-го объема по 50 мл	5-ти объемов по 10 мл				
1	4	16,1	0,4095	1,9	113,9
1	3	9,3	0,3422	1,1	77,4
1	2	5,6	0,3218	0,7	46,4
1	1	3,2	0,3039	0,4	26,2
1	0	1,4	0,2500	0,2	11,5
0	5	6,9	0,0010	0,8	57,6
0	4	5,1	0,0060	0,6	42,5
0	3	3,6	0,0222	0,4	29,6
0	2	2,2	0,0671	0,3	18,5
0	1	1,1	0,1937	0,1	8,8

Методы санитарно-микробиологического анализа *питьевой воды*

Методические указания
МУК 4.2.671—97

Редактор Максакова Е. И.

Технический редактор Киселева Ю. А.

Подписано в печать 10.09.97

Формат 60x90/16. Печ. л. 2,25

Тираж 3000 экз. Заказ 91

ЛР № 020877 от 20.05.94 г.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Информационно-издательским центром Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11. Отдел реализации, тел. 198-61-01

gost.e-ecolog.ru