Министерство жилищно-коммунального хозяйства РСФСР

Ордена Трудового Красного Знамени

Академия коммунального хозяйства им.К.Д.Памфилова

Согласовано

Зам.Главного Государственного санитарного врача РСФСР

Г.А. Аввакумов

(письмо № 07(ВК I7-7I от 0I.02.84г.)

Утверждено

приказом Министерства жилищно-коммунального хозяйства РСФСР

от 2I января I987 г. № 38

М Е Т О Д И Ч Е С К И Е У К А З А Н И Я

ПО ПРОВЕДЕНИЮ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ВОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ ИНДИКАТОРНЫХ БУМАЖНЫХ (СИБ

Издание второе

Москва I988

gost.e-ecolog.ru

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Важная роль санитарно-микробиологического контроля окружающей среды в профилактике кишечных инфекций обусловливает актуальность разработки новых и совершенствования существующих методов индикации санитарно-показательной микрофлоры.

Как известно, показателем степени фекального загрязнения служит количество бактерий группы кишечных палочек, определяемое в I л воды (коли-индекс). Проведение санитарно-бактериологического анализа питьевой воды регламентировано в настоящее время ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа" и ГОСТ 24849-81 "Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа". В качестве этапа накопления бактерий используют два метода - титрационный и мембранных фильтров. Выращивание микроорганизмов производят на дифференциально-диагностических лактозосодержащих средах типа Эндо. Для дальнейшего исследования отбирают колонии, характерные для бактерий группы кишечных палочек, которые идентифицируют по ограниченному количеству ключевых тестов: к бактериям группы кишечных палочек относятся грамотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа при $37\pm1,0^{0}$С в течение 5-24 ч и не обладающие оксидазной активностью.

В некоторых случаях при определении коли-индекса необходимы дополнительные исследования на наличие бактерий - показателей свежего фекального загрязнения (кишечных палочек,

способных ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44±I,0°С и образовывать индол при этой же температуре).

Таким образом, при санитарно-бактериологическом исследовании питьевой воды решающими являются биохимические тесты: наличие оксидазной активности, характер ферментации глюкозы и лактозы и способность образовывать индол.

Эти свойства кишечных палочек в соответствии с упомянутыми ГОСТами определяются с использованием дефицитных реактивов и дифференциально-диагностических сред, имеющих срок хранения от 7 сут до I мес, а реактив для определения оксидазной активности готовят непосредственно перед определением.

На основании проведенных исследований для выявления оксидазной активности, характера ферментации глюкозы и лактозы, а также индолообразования рекомендуется использовать СИБ Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии взамен применяемых реактивов и дифференциально-диагностических сред по ГОСТ 18963-73.

Преимущества применения СИБ по сравнению с общепринятыми методами заключаются в простоте и ускорении анализа вследствие исключения этапа приготовления реактивов и дифференциально-диагностических сред, а следовательно, и потребности в дефицитных ингредиентах. Особое значение приобретает работа с СИБ при выполнении анализов в полевых условиях вне стационарной лаборатории.

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Аппарат для фильтрования; автоклав электрический по ГОСТ 9586-75; термостаты электрические для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до 50°С и термометром с ценой деления 0,2°С.

Пробирки бактериологические по ГОСТ I0515-75; чашки бактериологические (Петри) по ГОСТ I0973-75; вата гигроскопическая медицинская по ГОСТ 5556-75; проволока из никелевых сплавов диаметром 0,3-0,5 мм по ГОСТ 492-73; фильтры мем-

бранные № 2 и 3, выпускаемые Мытищинской экспериментальной фабрикой ультрафильтров по ТУ-204 РСФСР-053-78; мембраны "Владипор" марки МФА-МА 5-6, выпускаемые производственным объединением "Тасма" им. В.В.Куйбышева по ТУ-6-05-1003-81 и др.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72; спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962-67.

Агар сухой питательный по ГОСТ 11206-71; пептон сухой для бактериологических целей по ГОСТ 13805-68; СИБ с глюкозой, с лактозой,на оксидазу и на индол по ТУ-42.14.128.78; среда Эндо сухая питательная.

ХАРАКТЕРИСТИКА СИБ

Системы индикаторные бумажные представляют собой полоски или диски хроматографической бумаги, пропитанные соответствующими субстратами и индикаторами и покрытые для стабилизации пленкообразующим полимером - водным раствором поливинилового спирта.

СИБ с глюкозой и лактозой представляют собой диски диаметром 0,8-1,0 см, СИБ на оксидазу выпускается в виде полосок размером 8х1 см или дисков диаметром 3,5х4,0 см, СИБ на индол - в виде полосок размером 8х1,0 см. Срок годности СИБ указан на этикетках (2 года).

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИБ

Определение оксидазной активности бактерий

Постановка оксидазного теста при работе бродильным методом

По 2-3 изолированные колонии каждого типа, выросшие на секторах чашки со средой Эндо, снимают частично петлей и наносят штрихом на диск СИБ-оксидазы (диск помещают в чашку Петри). Оставшуюся часть колонии используют для изучения

ферментации глюкозы. При положительной реакции в месте нанесения культуры бумажка синеет в течение I мин, при отрицательной - цвет ее не изменяется. В ряде случаев оксидазный тест со среды Эндо проявляется недостаточно четко, особенно при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет. В таких случаях нужно пересеять колонии со среды Эндо на сектор чашки с питательным агаром или на скошенный питательный агар и после подращивания при температуре $37\pm1,0^{0}$С в течение 3-5 ч пробу повторить.

Постановка оксидазного теста при работе методом мембранных фильтров

Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями переносят пинцетом, не переворачивая на бумажный диск СИБ-оксидазы диаметром 3,5-4,0 см (по наиболее принятому размеру фильтра), который предварительно рекомендуется смочить стерильной дистиллированной водой. Через 3-4 мин определяют результат. Все посиневшие колонии, а также колонии с синим ободком не относятся к семейству Enterobacteriaceae, их не учитывают. Мембранный фильтр сразу же после четкого проявления реакции переносят обратно на среду Эндо, и немедленно (не позднее 5 мин) пересеивают оксидазоотрицательные колонии по 2-3 колонии каждого типа для определения ферментации глюкозы.

Определение характера ферментации глюкозы

Определение характера ферментации глюкозы на плотной питательной среде (чашечный метод)

В чашку Петри тонким слоем (I0 мл) наливают питательный агар pH 7,2-7,8 (не ниже 7,2). Подозрительные на кишечную палочку колонии засевают петлей на сектор чашки по ее периферии. На одной чашке может быть исследовано до 6-8 культур. На место посева (площадка около 0,5 $см^{2}$) накладывают диск СИБ-глюкозы. Для улавливания газообразования и фиксации дис-

ка последний заливают несколькими каплями расплавленного и остуженного до 40-45°С полужидкого агара (0,6-0,8%). Инкубируют при температуре 37±1,0°С. При разложении глюкозы до образования кислоты цвет диска меняется из красного в желтый. При наличии газообразования пузырьки газа скапливаются по краям диска и между диском и агаром. В качестве контроля необходимо использовать диски без посева культуры. Красный цвет их не меняется. Различие в цвете контрольных и опытных дисков служит для сравнения при учете реакции.

Результаты учитывают в течение 3-5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности культуры. Возможен второй вариант определения характера ферментации глюкозы на плотной питательной среде. В чашку Петри толстым слоем (20 мл) наливают агар с pH 7,2-7,8 (не ниже 7,2). Диски СИБ-глюкозы стерильно разрезают пополам. Половину диска берут пинцетом, острым краем диска забирают подлежащую изучению колонию и вводят в толщу агара под углом к поверхности. На одной чашке может быть исследовано до 10 колоний. При этом не следует допускать образования пузырьков воздуха и опускания диска до дна чашки. Посевы инкубируют при температуре 37±1,0°С. При разложении глюкозы до образования кислоты цвет диска и окружающей среды меняется из красного в желтый. При образовании газа он скапливается по поверхности диска и между диском и агаром. В качестве контроля используют диск СИБ-глюкозы без культуры. Красный цвет его и окружающей среды не меняется.

Результаты учитывают через 1-5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности бактерий. При образовании кислоты и газа результат анализа считают положительным. При наличии только кислоты или отсутствии кислоты и газа получают отрицательный результат. В обоих вариантах определение заканчивают через 5 ч. Позже учитывать результаты реакции в ряде случаев затруднительно, так как через 5-6 ч начинается подщелачивание среды за счет протеолиза белков, желтая зона вновь розовеет и приобретает первоначальный красный цвет.

Определение характера ферментации глюкозы в жидкой питательной среде (пробирочный метод)

В пробирки с 1 мл 0,5%-ной пептонной воды или питательного бульона (рН 7,4–7,8) и небольшим клочком гигроскопической ваты вносят петлей изучаемую колонию и пинцетом диск СИБ-глюкозы. Для ускорения ответа пробирки со средой можно подогреть до температуры 37°С. Среда в пробирках в результате быстрой диффузии в нее индикатора, импрегнированного в бумаге, становится красной. Посевы инкубируют при температуре 37±1,0°С. При ферментации глюкозы с образованием кислоты и газа среда приобретает желтый или оранжевый цвет, а пузырьки газа скапливаются между волокнами ваты. В качестве контроля используют пробирки со средой и СИБ-глюкозой без культуры.

Результаты учитывают в течение 1–5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности бактерий. При образовании кислоты и газа результат считают положительным. Отсутствие кислоты и газа свидетельствует об отрицательном результате. При наличии только кислоты пробирки оставляют в термостате для окончательного учета через 24 ч. Отсутствие газообразования через 24 ч позволяет дать окончательный отрицательный ответ, наличие газообразования – положительный.

Определение бактерий-показателей свежего фекального загрязнения

Изучение ферментации лактозы и образования индола осуществляется раздельно в двух пробирках: в одной – ферментация лактозы во второй – образование индола.

При определении лактозной активности в пробирку с 1 мл 0,5%-ной пептонной воды или питательного бульона (рН 7,4–7,8) и небольшим клочком гигроскопической ваты помещают пинцетом диск СИБ-лактозы. Пробирки подогревают до температуры 44°С, затем в них петлей засевают исследуемые колонии. Среда в пробирках становится красной в результате диффузии в нее

индикатора, импрегнированного в диске. Посевы инкубируют при температуре 44±0,5°С. При ферментации лактозы с образованием кислоты и газа среда приобретает желтый или оранжевый цвет, а пузырьки газа скапливаются между волокнами ваты.

При определении индолообразования в пробирки с I мл 0,5%-ной пептонной воды или питательного бульона (pH 7,4-7,8), предварительно подогретые до температуры 44°С, петлей засевают исследуемые колонии и вносят полоски СИБ-индола. Индикаторную полоску складывают по коричневой разделительной полосе вдвое и пинцетом опускают на дно пробирки так, чтобы большой бесцветный конец погружался в среду, а короткий конец, имеющий желтую окраску, находился над поверхностью среды. Вследствие образования индола короткий конец индикаторной полоски меняет желтый цвет на розовый или ярко-малиновый. В качестве контроля используют пробирки со средой, содержащие СИБ с лактозой или СИБ на индол, без культуры. Цвет их при инкубации не меняется. В обоих случаях (как при изучении ферментации лактозы, так и образования индола) результаты учитывают в течение 3-5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности бактерий. В случае необходимости учет результатов можно проводить через 8-24 ч (желтый цвет среды, пузырьки газа и розово-малиновый цвет индикаторной полоски сохраняются). При ферментации лактозы с образованием кислоты и газа и при образовании индола результат считают положительным. Отсутствие кислоты, газа и индола свидетельствует об отрицательном результате. В случае образования только кислоты или кислоты и газа без индола пробирки оставляют в термостате для окончательного учета через 24 ч. Отсутствие газообразования или индола через 24 ч позволяет дать отрицательный ответ, наличие кислоты, газа и индола - положительный.

Примечания. I. Исследования проводят с колониями, выросшими на мембранном фильтре или на плотной питательной среде.

2. Аппликацию (введение) СИБ в плотную среду или в пробирки с жидкой средой производят обожженным пинцетом.

3. Критерием правильности учета реакции ферментации глюкозы, лактозы и образования индола при использовании СИБ должны быть четкие различия в окраске по сравнению с контролем (СИБ в среде без посева культуры).

4. Для определения активности оксидазы можно использовать тот же сектор чашки, на котором изучается ферментация глюкозы. Дополнительный посев культуры при этом рекомендуется проводить на участке сектора, расположенного ближе к центру чашки.

5. Основные дефекты при применении СИБ-глюкозы и СИБ-лактозы зависят от несоблюдения режима pH, от использования посуды, обработанной различными моющими средствами и недостаточно отмытой от них, от несоответствия фактических данных сухих сред указанным на этикетках и т.д.

gost.e-ecolog.ru