МИНИСТЕРСТВО
ЖИЛИЩНО-КОММУНАЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА РСФСР

ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
АКАДЕМИЯ КОММУНАЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА им. К. Д. ПАМФИЛОВА

РУКОВОДСТВО
ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДА САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД

Отдел научно-технической информации АКХ
Москва, 1989

gost.e-ecolog.ru

Министерство жилищно-коммунального хозяйства РСФСР

Ордена Трудового Красного Знамени

Академия коммунального хозяйства им. К.Д.Памфилова

Согласовано

Минздравом РСФСР
Письмо № 07/5-653
от 29 декабря 1986 г.

Утверждено

Начальник Главводоканала
Минжилкомхоза РСФСР
Ю.И. Пефелов
30 декабря 1987 г.

РУКОВОДСТВО
ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДА САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД

Отдел научно-технической информации АКХ
Москва-1988

О Г Л А В Л Е Н И Е

I. Общие положения 4
II. Схема бактериологического контроля качества сточных вод и воды загрязняемых ими водоемов 5
III. Применение фильтрующих мембран Владипор марок МФА-МА № 5, 6, 7, 8 для определения содержания ЛКП или БГКП 7
IУ. Применение СИБ для идентификации ЛКП и БГКП . . . 17

В последние годы два новых отечественных материала – фильтрующие мембраны Владипор типа МФА-МА и Системы индикаторные бумажные успешно использованы для совершенствования санитарно-бактериологического контроля качества питьевой воды.

С учетом этого опыта НИИ коммунального водоснабжения и очистки воды АКХ им. К.Д.Памфилова, трестом Росводоканалналадка, кафедрой коммунальной гигиены I Московского медицинского института им. И.М.Сеченова, Горьковским НИИ эпидемиологии и микробиологии, трестом Мосочиствод проведены (1984-1986 гг.) исследования на сточных водах, которые показали, что вышеназванные материалы целесообразно использовать и при санитарно-бактериологической оценке качества сточных вод. На основании этих и ранее проводившихся методических работ, выполненных совместно с НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н.Сысина и I Московским медицинским институтом, составлено настоящее руководство.

Руководство предназначено для лабораторий производственных управлений водопроводно-канализационного хозяйства, выполняющих технологический контроль за работой сооружений по обработке сточных вод и контролирующих по обязательным санитарно-бактериологическим показателям эпидемиологическую безопасность прошедшей обработку сточной воды и воды водоема, в который сточная вода сбрасывается. В этой части руководство может быть использовано и лабораториями санитарно-эпидемиологических станций. Основные положения руководства включены в Проект ГОСТ "Охрана природы. Гидросфера. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевых, природных и сточных вод".

1. [illegible]

1. При санитарно-бактериологической оценке качества городских сточных вод обязательным является определение коли-индекса. Этот контроль проводят по содержанию в сточных водах лактозоположительных кишечных палочек (ЛКП). Этот же показатель определяют при оценке качества воды водоема, в который сбрасывают сточные воды. В тех случаях, когда сточные воды подлежат дальнейшей утилизации в открытых системах технического водоснабжения, качество их контролируют по содержанию в них бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

Группа ЛКП или колиформных бактерий (по международной терминологии) включает всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* (грамотрицательные, не образующие спор палочки с отрицательным оксидазным тестом), ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 37°С в течение 1–24 ч. Индекс ЛКП определяют методом мембранных фильтров, бродильным (титрационным) методом или прямым посевом при предполагаемом содержании ЛКП свыше 50 кл/см^3.

Группа БГКП включает всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* (грамотрицательные, не образующие спор палочки с отрицательным оксидазным тестом), объединяемых по признаку ферментации глюкозы при температуре 37°С с образованием кислоты и газа в течение 1–24 ч. Индекс БГКП определяют методом мембранных фильтров или бродильным (титрационным).

Индексы ЛКП и БГКП характеризуют степень фекального загрязнения воды водных объектов и косвенно – эпидемической опасности в отношении возбудителей кишечных инфекций.

2. Развитые в стране промышленного производства фильтрующих мембран Владипор марок МФА-МА № 5, 6, 7, 8 (выпускает Казанское производственное объединение "Тасма" им. В.В.Куйбышева Минхимпрома СССР), а также фильтровального аппарата для микробиологических анализов воды (индекс АФ, выпускают заводы Минжилкомхоза РСФСР) позволяет более широко использовать при санитарно-бактериологическом контроле качества сточных вод метод мембранных фильтров. Преимущества, кото-

рые предоставляет использование этого метода, наиболее выражены в сравнении с бродильным методом: повышение точности анализа, сокращение его продолжительности, трудоемкости, экономия питательных сред, лабораторной посуды, электроэнергии. Отдельные из перечисленных положений верны и в сравнении с простым, удобным, точным методом прямого посева: возможность экономии лабораторной посуды, питательных сред. Однако основным преимуществом перед ним мембранного метода является возможность концентрирования исследуемых бактерий на мембране, т.е. одномоментное исследование большего объема сточной воды, что наиболее существенно при анализе обработанных сточных вод, в их числе и подлежащих утилизации.

3. Применение индикаторных бумажных систем (выпускает экспериментальный завод Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР) по сравнению с традиционной идентификацией бактерий семейства Enterobacteriaceae дает снижение трудозатрат (в основном в подготовительном периоде), возможность в ряде случаев сокращения продолжительности анализа, оно экономически целесообразно.

II. СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД И ВОДЫ ЗАГРЯЗНЯЕМЫХ ИМИ ВОДОЕМОВ

4. Методы выделения и идентификации бактерий, которые возможно использовать при анализе различных сточных вод и воды водоема, в который сбрасываются сточные воды, представлены в таблице.

5. Метод мембранных фильтров (с применением фильтрующих мембран Владипор марок МФА-МА № 5, 6, 7, 8, фильтров мембранных нитроцеллюлозных № 2, 3 (мытищинских) или других аналогичных мембран) может использоваться для выделения бактерий из необработанной, осветленной, очищенной, очищенной и хлорированной сточной воды, из воды водоемов.

Прямой посев следует применять при исследовании вод с индексом ЛКП не ниже 10^4 кт/л: несбработанной, осветленной и очищенной сточной воды, а также воды водоемов.

Таблица

Применение методов бактериологического анализа для контроля качества сточных вод и воды водоемов

Анализируемый объект	Анализируемый показатель	Метод выделения кишечных палочек			Метод идентификации кишечных палочек			
		Мембранный	Прямого посева	Бродильный	Окраска по Граму	СИБ		
						Оксидаза	Лактоза	Глюкоза
Сточная вода								
Необработанная	ЛКП	+	+	–	–	–	–	–
Осветленная	ЛКП	+	+	–	–	–	–	–
Очищенная:								
направляемая на обеззараживание	ЛКП	+	+	–	–	–	–	–
сбрасываемая в водоем	ЛКП	+	+	–	±	+	±	–
После обеззараживания:								
сбрасываемая в водоем или утилизируемая в закрытых системах технического водоснабжения	ЛКП	+	–	+	±	+	±	–
утилизируемая в открытых системах технического водоснабжения	БГКП	+	–	+	+	+	–	+
Вода водоема	ЛКП	+	+	–	±	+	±	–

Примечание. "+" – целесообразный метод для данного определения; "–" – метод, применение которого для данного определения возможно, но менее целесообразно; "±" – исследование проводится только в сомнительных случаях или при неблагоприятной санитарно-эпидемиологической обстановке.

Бродильный метод целесообразно использовать при анализе сточной воды, подвергавшейся хлорированию.

6. Идентификацию бактерий, выделенных из необработанной сточной воды и на этапах обработки ограничивают учетом по внешнему виду колоний на среде Эндо. Оксидазный тест, окраску по Граму, посевы на сахара не производят.

При идентификации бактерий, выделенных из сточной воды, подлежащей сбросу в водоем или утилизации в закрытых системах технического водоснабжения, а также воды водоема, выполняют оксидазный тест. В сомнительных случаях или при неблагоприятной санитарно-эпидемиологической обстановке исследуют бактерии с помощью СИБ-лактозы или посевом в полужидкую среду с лактозой, производят окраску по Граму.

В тех случаях, когда идентифицируют бактерии, выделенные из сточной воды, подлежащей последующей утилизации в открытых системах технического водоснабжения, производят оксидазный тест с СИД-оксидазой или с реактивом, окраску по Граму, посев на СИБ-глюкозу или в полужидкую среду с глюкозой.

Ниже приводятся рекомендации по определению коли-индекса исследуемых вод с использованием новых материалов – фильтрующих мембран Владипор типа МФА-МА и СИБ.

Другие (традиционные) методы выделения и идентификации бактерий в настоящих рекомендациях не приводятся, поскольку они изложены ранее в "Методике технологического контроля работы очистных сооружений городской канализации" (М.:Стройиздат, 1977).

Ш. ПРИМЕНЕНИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХ МЕМБРАН ВЛАДИПОР МАРОК МФА-МА № 5, 6, 7, 8 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЛКП ИЛИ БГКП

1. Мембраны с фильтровальным аппаратом

7. Отбор проб. Сточные воды отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил эпидемической безопасности для лиц, осуществляющих отбор проб. При отборе хлорированной сточной

воды в емкость до ее стерилизации вносят серноватистокислый натрий из расчета 15–20 мг на 500 $см^3$ пробы сточной воды.

Пробы воды водоемов отбирают с соблюдением правил стерильности в стерильные емкости с глубины 10–15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. При необходимости отбора проб на разных глубинах придонные пробы отбирают в 30–50 см от дна. Отбор проб производят в местах, где глубина водоема не менее 0,5 м. Используют различные плавсредства, мосты, помосты и т.п. Недопустимо производить отбор проб с берега. Проруби делают, избегая внесения в воду загрязнений со льда и инструментов. При отборе нескольких проб одним батометром его каждый раз обеззараживают фламбированием. Отобранную пробу маркируют. Места отбора проб и кратность устанавливают в соответствии с документами водно-санитарного законодательства, действующими для каждого объекта.

8. Хранение проб. Анализ должен быть проведен в пределах 2 ч после отбора пробы. Допускается хранение пробы при температуре 4–10°С в течение 6 ч.

9. Транспортирование проб. При транспортировке пробы следует предохранять от замерзания, действия прямых солнечных лучей, резких толчков и т.д.

10. Аппаратура, оборудование, материалы, реактивы, коммерческие питательные среды, окраска бактерий по Граму, постановка оксидазного теста с реактивом – см. ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа".

11. Приготовление среды Эндо (модификация). Среду готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. В готовую и охлажденную до 60–70°С среду перед разливкой в чашки допускается для подавления роста посторонних бактерий, препятствующих получению на фильтрах изолированных колоний, прибавлять на 100 $см^3$ среды: 0,2 мл 10%-ного спиртового раствора основного фуксина, 0,4–0,5 $см^3$ 5%-ного водного раствора фенола и 1,8 $см^3$ этилового спирта. Затем среду разливают в чашки Петри по 15–20 $см^3$. Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить, поместив их с приоткрытыми крышками в термостат. Срок хранения чашек

со средой не более 2-3 сут в темноте при температуре 4°С; добавок - не более 6 мес.

12. Подготовка мембран к работе. На дно сосуда, в котором производят кипячение (химический стакан, эмалированная кастрюля и т.п.), помещают "сторож для молока" или нержавеющую сетку для ограничения бурного кипения. Дистиллированную воду заливают в этот сосуд в небольшом объеме, ограничивающем свободное вращение в ней фильтрующих мембран, но достаточном для того, чтобы предназначенные для стерилизации фильтрующие мембраны оказались при погружении покрытыми водой. Дистиллированную воду доводят в сосуде до 80-90°С и убавляют нагрев. После этого на поверхность воды по одной помещают фильтрующие мембраны, визуально проверенные на отсутствие трещин, отверстий, пузырей и т.д. Воду с помещенными в нее мембранами медленно доводят до кипения и кипятят на слабом огне в течение 10-15 мин. Затем эту воду сливают и заменяют небольшим количеством (чтобы покрыть фильтрующие мембраны) стерильной дистиллированной воды. После этого фильтрующие мембраны готовы к употреблению. Повторное кипячение фильтрующих мембран не требуется.

13. Подготовка фильтровального аппарата к анализу. Перед посевом пробы воды ячейку фильтровального аппарата стерилизуют фламбированием после обтирания ватным тампоном, смоченным спиртом. После охлаждения в центр нижней части фильтровального аппарата (столика) фламбированным пинцетом укладывают вверх рабочей поверхностью (более блестящей) стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют фиксирующим устройством, если оно предусмотрено конструкцией прибора.

14. Подготовка проб исследуемой воды к посеву. При выборе объемов посева или необходимого разведения анализируемых вод ориентируются на результаты предыдущих исследований и ориентировочную схему посева, приведенную ниже. Необходимо, чтобы при анализе не менее чем на двух мембранах выросли изолированные колонии, среди которых не более 10 колоний ЛКП (или БГКП, если определяют этот показатель). При анализе воды

Объект исследования	Объем засеваемой воды для определения коли-индекса
Сточные воды:	
до очистки и обеззараживания	0,01-0,000001 или 0,001-0,000001
после очистки	1-0,00001 или 1-0,0001
Сточные воды после очистки и обеззараживания:	
сбрасываемые в водоем	10-0,001
утилизируемые	40, 10, 1 или 60, 30, 10*
Водные объекты:	
в зоне выпуска сточных вод	1, 0,1, 0.01 или 0,1, 0,01, 0,001
загрязняемые сточными водами	10, 1, 0,1 или 1, 0,1, 0,01

*Объем исследуемых проб может быть изменен в зависимости от интенсивности роста посторонних бактерий на фильтрах и величин коли-индекса, допускаемого соответствующим нормативом на утилизируемые сточные воды.

неизвестного качества следует фильтровать не менее 3-4 десятикратных объемов или разведений. Разведения следует готовить в объеме 10 мл. При необходимости допускается для подавления роста посторонних бактерий в подготовленные к анализу объемы или разведения проб непосредственно перед их посевом на мембраны вносить добавки из расчета на 10 мл пробы 0,2 мл 1%-ного спиртового раствора основного фуксина; 0,4 мл 0,5%-ного водного раствора фенола; 0,18 мл этилового спирта. Раствор фуксина и фенола готовят, разводя в 10 раз их растворы, приготовленные для внесения в среду Эндо. Контакт проб с добавками не должен превышать 10 мин.

15. Фильтрование воды. В верхнюю часть (стакан, воронку) подготовленного к работе фильтровального аппарата наливают точно отмеренный объем воды, затем создают вакуум в нижней части прибора. Для посева каждой пробы используют стерильный фильтровальный аппарат.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат (без дополнительного фламбирования) сначала меньшие, затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры. Разведения одной пробы фильтруют через один фильтровальный аппарат (без дополнительного фламбирования), начиная с больших разведений; при фильтровании каждого последующего разведения меняют фильтры.

При фильтровании 1 $см^3$ исследуемой воды или ее разбавления в воронку следует предварительно налить 5-10 $см^3$ стерильного раствора для разбавлений, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования воронку снимают, фильтрующую мембрану осторожно приподнимают за край фламбированным пинцетом при сохранении вакуума для тщательного удаления остатков воды на нижней стороне фильтра (подсушивания), а затем переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая передвижения мембраны по поверхности среды, пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева, номера пробы. На одну чашку можно поместить 4-5 мембран с условием, чтобы они 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 оба фильтра переносят на плотную питательную среду (раздельно) и при вычислении результатов анализа учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

16. Проведение анализа. Выбранные и подготовленные к анализу объемы воды фильтруют через мембраны Владипор марок МФА-МА № 5, 6, 7 или 8. Хорошо подсушенные мембраны помещают на среду Эндо, ставят в термостат дном вверх, инкубируют

при температуре 37 $\pm$0,5°С в течение 18-28 ч, после чего приступают к учету результатов.

17. Учет результатов при определении ЛКП. К учету приступают через 18-24 ч при наличии на мембранных фильтрах колоний, характерных для ЛКП(темно-красные и красные, с металлическим блеском и без него, розовые с красным центром, розовые слизистые крупные выпуклые, дающие красные или темно-красные отпечатки на обратной стороне фильтра). Если на фильтрах нет роста или имеются нехарактерные для ЛКП колонии (пленчатые, губчатые, с неровными краями и поверхностью, плесневые и т.д.), к учету результатов приступают через 24 ч, дают отрицательный ответ: ЛКП отсутствуют в анализируемом объеме.

Если рост ЛКП обнаружен, подсчет их количества производят на тех фильтрах, где выросли изолированные колонии и число колоний, характерных для ЛКП, не более 30. Допустимо вести учет на фильтрах с числом колоний более 30 или по одному фильтру, но с обязательной оговоркой об этом в приложении к протоколу анализа.

В соответствующих случаях (см. п. 6) анализ завершается на этом этапе, производится вычисление индекса ЛКП.

При необходимости идентификации бактерий (см. п. 6) после подсчета количества колоний, характерных для ЛКП, выполняют оксидазный тест с СИБ-оксидазой (п. 21) или с реактивом по ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа" или путем накапывания в соответствии с "Методическими указаниями по санитарно-микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов" (утверждены приказом Минздрава СССР № 2285-81 от 19.01.81). Все колонии, которые полностью или частично (ободок) приобрели сине-фиолетовую окраску, исключают из учета. Подсчитывают количество характерных для ЛКП колоний, окраска которых не меняется. Если дальнейшая идентификация не требуется, вычисляют индекс ЛКП.

Если необходимо продолжение исследования (см. п. 6), по 2-3 изолированных колонии каждого типа из числа оксидазо-

отрицательных характерных для ЛКП колоний подвергают дальнейшей идентификации: готовят мазки для исследования по Граму* и одновременно делают посев в пептонную воду с СИБ-лактозой (гл. 4) или в полужидкую среду с лактозой. Посев необходимо делать как можно быстрее, не позднее 5 мин после проявления оксидазной реакции, так как реактив для оксидазного теста обладает бактерицидностью. Учитывают колонии, которые ферментируют лактозу до кислоты и газа. Подсчитывают сумму колоний таких типов. Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то для вычисления количества лактозоположительных колоний этого типа в данном объеме используют формулу a·c/B, где a – общее число колоний данного типа; B – число проверенных из них; c – число проверенных колоний с положительным результатом. Вычисляют индекс ЛКП.

Для вычисления индекса ЛКП (количество ЛКП в I $дм^3$ воды) суммируют количество колоний ЛКП и делят на объем воды, профильтрованной через эти фильтры, выраженный в кубических дециметрах.

При отсутствии на фильтрах колоний кишечных палочек индекс ЛКП будет меньше той величины, которая была бы определена в случае обнаружения в анализируемом объеме одной колонии кишечной палочки, например, при посеве I мл не выросло ни одной колонии. Индекс ЛКП будет менее I000, он вычисляется следующим образом:

I кол.:0,00I $дм^3$=I000 или (I кол.xI000 $см^3$):I $см^3$=I000.

Если колонии выросли на одном из нескольких фильтров, то в расчет принимают объем воды, профильтрованный через все фильтры. Например, если при посеве I, I0, 40 $см^3$ воды на 3 фильтра на одном из них выросло 3 колонии ЛКП, на двух дру-

---

*Нечеткие результаты окраски по Граму могут быть уточнены: исследуемую культуру суспендируют в капле 3%-ного раствора КОН на предметном стекле. Если бактерии грамотрицательны, жидкость в капле становится вязкой, за бактериологической петлей тянутся нити на 0,5–2 см. Учет более удобен на темном фоне.

тих роста нет, то индекс ЛКП равен 3 кол.: 0,05I $дм^3$ = 58 или (3 кол. х I000 $см^3$): 5I $см^3$ = 58. Если при посеве I и I0 $см^3$ воды на одном фильтре выросла I колония ЛКП, на другом - 5 колоний, то индекс ЛКП равен (I+5 кол.):0,0II $дм^3$= = 545 или (6 кол. х I000 $см^3$): II $см^3$ = 545.

В случаях, когда на одном или нескольких фильтрах получен сплошной рост бактерий и подсчет колоний невозможен, в расчет принимают объем воды, профильтрованный через фильтры, на которых удалось провести учет. Например, если при посеве I0 $см^3$ сплошной рост, а при посеве I $см^3$ - I2 ЛКП, то индекс ЛКП равен I2 кол.: 0,00I $дм^3$ = I2000 = $1{,}2 \cdot 10^4$ или (I2 х I000 $см^3$): I $см^3$ = I2000 = $1{,}2 \cdot 10^4$.

I8. Учет результатов при определении БГКП. К учету приступают при отсутствии роста колоний через 24-28 ч, при наличии колоний, характерных для БГКП, через I8-24 ч.

При отсутствии каких-либо колоний на фильтрах или при росте нехарактерных для кишечных палочек колоний (пленчатых, губчатых, с неровными краями или поверхностью, плесневых и т.д.) дают отрицательный ответ на присутствие БГКП в анализируемом объеме.

При наличии на фильтрах колоний, характерных для БГКП (темно-красных с металлическим блеском и без него, красных, розовых с красным центром, розовых, бесцветных и др.) выполняют оксидазный тест с помощью СИБ-оксидазы (п. 2I) или с реактивом. Положительная реакция (синий цвет колонии или ее краев) всех колоний позволяет дать отрицательный ответ.

При наличии на мембранных фильтрах колоний, характерных для БГКП с отрицательным оксидазным тестом, подсчитывают раздельно число колоний каждого типа. Темно-красные с металлическим блеском и без него (лактозоположительные) колонии с четким отпечатком на обратной стороне фильтра, оксидазоотрицательные исследуют по Граму*. Убедившись в том, что эти колонии образованы грамотрицательными палочками, их относят к

*Возможен уточняющий тест с КОН (см. п. I7).

БГКП без подтверждающего этапа. Эти колонии проверяют на способность ферментировать глюкозу только в арбитражных и сомнительных случаях.

Если на фильтре выросли только такие лактозоположительные колонии, то их количество подсчитывают и дают положительный ответ на наличие БГКП в исследуемом объеме воды.

При наличии на фильтрах колоний других типов (красных, розовых, бесцветных) для подтверждения их принадлежности к БГКП берут по 2-3 изолированных колонии каждого типа, готовят мазки с последующей окраской по Граму и одновременно делают посев в пептонную воду с СИБ-глюкозой (гл. 5)) или на полужидкую среду с глюкозой. Посев необходимо делать как можно быстрее, не позднее 5 мин после проявления оксидазной реакции, так как реактив для оксидазного теста обладает бактерицидностью.

В тех случаях, когда при выборочной проверке колоний одного какого-либо типа получены неодинаковые результаты, количество БГКП среди колоний этого типа в исследованном объеме воды вычисляют по формуле $a \cdot c/B$, где a – общее число колоний данного типа; B – число проверенных из них; c – число колоний, ферментирующих глюкозу до кислоты и газа.

Количество БГКП на фильтре определяют по сумме лактозоположительных колоний и колоний других типов, образованных грамотрицательными оксидазоположительными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа при температуре 37°С $\pm$0,5°С в течение 24 ч.

Результат анализа выражают индексом БГКП (количество БГКП в I дм^3 воды). Для подсчета индекса число колоний БГКП, подсчитанных на фильтрах, делят на объем профильтрованной через эти фильтры воды, выраженный в кубических дециметрах (подобно тому, как вычисляют индекс ЛКП).

2. Мембраны без фильтровального аппарата

Подготовка, проведение и учет анализа коли-индекса сточной воды методом мембранных фильтров без фильтровального ап-

парата в основном соответствует описанному в гл. I. Исключение составляют п. 13 (не требуется подготовка фильтровального аппарата) и п. 15 (фильтрование воды проводится иначе). Дополнительные сведения приводятся ниже.

19. Подготовка фильтрующих подложек. Несколько слоев (8–10) фильтровальной бумаги (марка "розовая лента", "белая лента" или другая, быстро впитывающая воду фильтровальная бумага) с площадью большей, чем площадь фильтрующей мембраны, заворачивают в оберточную бумагу или укладывают в чашки Петри. Затем их стерилизуют автоклавированием при температуре 120 ± 2°С (10^6 Па) 1 ч или сухим жаром при температуре 160°С в течение 1–2 ч. При необходимости можно стерилизовать только 1–2 верхних слоя фильтровальной бумаги.

20. Фильтрование воды. Простерилизованные кипячением мембранные фильтры укладывают вверх рабочей поверхностью (более блестящей) на 8–10 слоев фильтровальной бумаги (1–2 верхних слоя обязательно предварительно простерилизовани). Пипеткой накапывают равномерно на поверхность мембраны отдельные порции предназначенного для исследования объема воды (не более 5 мл), не допуская ее растекания за пределы фильтрующей мембраны. Нужно быть особенно внимательным и не спешить при фильтрации первых капель пробы. Когда мембрана хорошо "прилижет" к подложке из фильтровальной бумаги, процесс фильтрации ускорится и накапывать пробу на мембрану можно чаще.

Для посева каждой пробы используют стерильные подложки из фильтровальной бумаги.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует на одной подложке фильтровать сначала меньшие, а затем бóльшие объемы воды, меняя каждый раз мембраны. При исследовании разведений одной пробы их фильтруют на одной подложке, начиная с бóльших разведений, каждый раз меняя фильтры.

Закончив фильтрование, дождавшись удаления влаги с мембраны, ее перекладывают, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая передвижения мембраны по поверхности среды, пузырьков воздуха между средой и

фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева, номера пробы. На одну чашку можно поместить 4–5 мембран с условием, чтобы они не соприкасались.

IУ. ПРИМЕНЕНИЕ СИБ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛКП И НГКП

3. Определение оксидазной активности бактерий

21. Постановка оксидазного теста при выделении бактерий методом мембранных фильтров. Мембранный фильтр с выросшими на нем изолированными колониями переносят пинцетом, не переворачивая, на помещенный в чистую чашку Петри диск СИБ-оксидазы, предварительно смоченный небольшим количеством (0,5–0,8 $см^3$) дистиллированной воды. 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 возвращают на среду Эндо, быстро подсчитывают оксидазоотрицательные колонии (не изменившие цвета), имеющие морфологию, характерную для бактерий семейства Enterobacteriaceae. При необходимости дальнейшего исследования немедленно (не позднее 5 мин) пересевают оксидазоотрицательные колонии по 2–3 колонии каждого типа для определения ферментации лактозы или глюкозы.

22. Постановка оксидазного теста при выделении бактерий бродильным (титрационным) методом или прямым посевом. По 2–3 изолированные колонии каждого типа, выросшие на секторах чашки со средой Эндо, частично снимают петлей и наносят штрихом на помещенный в чистую чашку Петри диск СИБ-оксидазы, предварительно смоченный небольшим количеством (0,5–0,8 $см^3$) дистиллированной воды. Оставшуюся часть колонии используют для изучения ферментации лактозы или глюкозы. При положительной оксидазной реакции в месте нанесения культуры бумажка синеет в течение 1–2 мин; при отрицательной реакции ее цвет не меняется. Подсчитывают на секторах чашки со средой Эндо

колонии только тех типов, которые оказались оксидазоотрицательными и имеют морфологию, характерную для бактерий семейства Enterobacteriaceae.

В некоторых случаях оксидазный тест бактерий, выросших на среде Эндо, проявляется недостаточно четко, особенно при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет. В таких случаях нужно пересеять колонии со среды Эндо на питательный агар, после подращивания в течение 3–5 ч при температуре 37 ± 0,5°С пробу на оксидазную активность повторить.

4. Определение ферментации лактозы

В пробирки с 1 мл 0,5%-ной пептонной воды (или питательного бульона), имеющей pH 7,4–7,8, предварительно подогретой до температуры 37 ± 0,5°С и с небольшим кусочком ваты, вносят петлей изучаемую колонию (или часть ее) с мембранного фильтра или со среды Эндо, профламбированным пинцетом погружают диск СИБ-лактозы. Среда в пробирке приобретает красный цвет. Посевы инкубируют при температуре 37 ± 0,5°С. При ферментации лактозы 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-лактозой без культуры. В сравнении с окраской среды в этих пробирках оценивают окраску среды в опытных пробирках.

Результаты учитывают в течение 1–5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности бактерий. При образовании кислоты и газа результат считается положительным. При отсутствии кислоты и газа, а также при наличии только кислоты пробирки оставляют в термостате. Окончательный учет производят через 24 ч. Отсутствие в пробирках кислоты и газа, так же как и отсутствие только кислоты или только газа, через 24 ч позволяет дать окончательный отрицательный ответ, наличие кислоты и газа – положительный.

5. Определение ферментации глюкозы

Ход исследования аналогичен изложенному в гл. 4, но вместо СИБ-лактозы используют СИБ-глюкозу.

Подп. в печ. 17. 04. 89г. Объем 1,25 п. л. Зак. 502 Тираж 1.000
Тип. ХОЗУ Минефтехимпрома СССР

gost.e-ecolog.ru