Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Использование метода измерения электрического сопротивления (импеданса) для санитарно-микробиологического исследования питьевой воды

Методические указания
МУК 4.2.1111—02

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2002

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.1
И88

И88 **Использование** метода измерения электрического сопротивления (импеданса) для санитарно-микробиологического исследования питьевой воды: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.—27 с.

ISBN 5—7508—0376—7

1. Разработаны Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Подунова Л. Г., Кривопалова Н. С., Сорокина Р. С.) при участии фирмы «SY-LAB», Австрия (М. Шинкингер, Соколов Д. М.).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Минздраве России (прот. № 12 от 14 февраля 2002 г.).

3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 26 февраля 2002 г., введены в действие с 1 мая 2002 г.

4. С момента ввода данных методических указаний считаются утратившими силу «Методические рекомендации по проведению бактериологических исследований питьевой воды с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100» № 01 - 19/82—23 от 22.05.96 и раздел 6 «Исследование питьевой воды» методических указаний МУК 4.2.590—96 «Бактериологические исследования с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100».

5. Введены впервые.

ББК 51.1

ISBN 5—7508- 0376—7

© Минздрав России, 2002
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач Российской
Федерации – Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
26 февраля 2002 г.
МУК 4.2.1111—02
Дата введения: 1 мая 2002 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Использование метода измерения электрического сопротивления (импеданса) для санитарно-микробиологического исследования питьевой воды

Методические указания

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора, осуществляющих контроль качества питьевой воды централизованных систем питьевого водоснабжения, а также для лабораторий организаций, предприятий и иных хозяйственных субъектов, обеспечивающих производственный контроль.

1.2. Методические указания устанавливают ускоренный метод качественного и количественного определения индикаторных микроорганизмов в питьевой воде в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

1.3. Настоящие методические указания разработаны для осуществления объективного, достоверного и быстрого санитарно-микробиологического анализа питьевой воды с целью контроля ее качества и для обеспечения безопасности и безвредности воды в централизованных системах питьевого водоснабжения.

2. Сущность метода

Методические указания содержат описание санитарно-микробиологического исследования питьевой воды по показателям качества СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100»* производства австрийской фирмы «SY-LAB».

Предлагаемый анализатор является автоматизированной системой, созданной на основе импедансной технологии и предназначенной для ускоренной количественной и качественной оценки степени микробного загрязнения исследуемой пробы.

Импеданс – это сопротивление потоку переменного тока через проводящий материал. Импедансная технология в микробиологии является непрямым культуральным методом для определения микроорганизмов с использованием измерения электрического сопротивления. Изменения импеданса происходят в питательной среде по мере того, как ее химический состав преобразуется в результате роста и метаболической активности микроорганизмов. Под действием микроорганизмов заряженные конечные продукты метаболизма выделяются в ростовую среду.

В основном незаряженные или слабозаряженные субстраты превращаются в сильнозаряженные конечные продукты: белки утилизируются до аминокислот, углеводы и жиры — до органических кислот и т. д. Образующиеся метаболиты имеют меньший размер и, таким образом, более подвижны. Эти электрохимические процессы приводят к существенным изменениям импеданса. Когда количество микроорганизмов достигает порога около 10^6—10^7 клеток/мл, наблюдаются экспоненциальные изменения импедансного сигнала. Время, необходимое для достижения значимого изменения импеданса, называется временем определения импеданса (IDT). Значение IDT обратно пропорционально начальной концентрации микроорганизмов в исследуемой пробе. Ход кривых импедансного сигнала соответствует и отражает кривую роста микроорганизмов в исследуемой пробе.

Селективные питательные среды, специально разработанные для измерения импеданса в системе «Бак Трак 4100», позволяют определять микробиологические показатели качества питьевой воды в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.4.1074—01 и сокращают сроки получения результатов.

---

* Далее «Бак Трак».

3. Нормативные ссылки

3.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52—ФЗ.

3.2. «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.93 № 5487—1.

3.3. Санитарные правила и нормы «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». СанПиН 2.1.4.1074—01.

3.4. Методические указания «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды». МУК 4.2.1018—01.

3.5. Методические указания «Бактериологические исследования с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100». МУК 4.2.590—96.

4. Проведение анализа

Исследование проводится по микробиологическим показателям качества питьевой воды, регламентированным СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

Определяемые показатели:

1. Общее число микроорганизмов в 1 мл.
2. Общие колиформные бактерии в 100 мл.
3. Термотолерантные колиформные бактерии в 100 мл.
4. Споры сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл.
5. Колифаги в 100 мл.

Отбор, хранение и транспортирование проб для исследования, а также подготовка их к анализу и методика работы при использовании мембранных фильтров проводятся в соответствии с требованиями МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

4.1. Определение общего числа микроорганизмов

1. Питательная среда: BiMedia 001 A, приготовленная в соответствии с требованиями инструкции изготовителя.

2. Протокол измерения.

2.1. Установить температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters):

Время исследования (Duration) –24 ч

Масштаб измерений (Scale):

• М-параметр	0—50 %
• Е-параметр	0—50 %
Время задержки (Delay)	1 ч

3. Установка пороговых значений (Thresholds):

3.1. В случае использования калибровочного файла для исследования питьевой воды параметры пороговых значений вносятся автоматически (имеется коммерческий калибровочный файл для исследования питьевой воды — WATER.COR).

3.2. При отсутствии калибровочного файла одновременно с посевом исследуемого образца воды на среду BiMedia 001 А производится определение общего количества бактерий классическим методом на чашках Петри в соответствии с требованиями МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

Наименования рекомендуемых для использования в данном случае питательных сред приведены в разделе 6 данных методических указаний.

Результаты, полученные при классическом методе исследования (КОЕ/CFU в 1 мл), вносят в соответствующий файл (MAIN MENU / DATA FUNCTION / ENTER VALUES). Основные этапы создания калибровочного файла рассмотрены в разделе 5 данных указаний.

4. Добавить в каждую измерительную ячейку по 9 мл среды BiMedia 001 А.

5. Внести 1 мл исследуемого образца воды в измерительную ячейку с 9 мл питательной среды.

6. Тщательно перемешать содержимое, вращая ячейку между ладонями (не переворачивать ячейку!).

7. Для контроля среды используют одну измерительную ячейку с 10 мл среды Bi Media 001 А (без инокулята).

8. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерение.

9. После того, как каждая позиция блока будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

При пересечении порогового значения происходит автоматический подсчет численности микроорганизмов в исследуемом образце воды.

Результат определения КОЕ (CFU) выдается автоматически в виде количества микроорганизмов в 1 мл исследуемого образца воды.

Учет результатов проводится по М-параметру.

4.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий

Исследование может проводиться одним из трех методов:

1) мембранной фильтрации с последующим тестированием на микробиологическом экспресс-анализаторе «Бак Трак»;

2) титрационным с предварительным этапом накопления бактерий в жидкой питательной среде;

3) прямого измерения с использованием измерительных ячеек прибора «Бак Трак» объемом 100 мл.

4.2.1. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации (основной метод)

Сущность метода заключается в концентрировании бактерий из установленного объема анализируемой пробы воды и дальнейшем определении показателя на приборе «Бак Трак». Используется метод мембранных фильтров в соответствии с МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

1. Среда BiMedia 160 B* приготовленная в соответствии с требованиями инструкции изготовителя.

2. Протокол измерения.

2.1. Установить температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Время исследования (Duration) – 24 ч

Масштаб измерений (Scale)

- М-параметр 0—50 %
- Е-параметр 0—50 %

Время задержки (Delay) 1 ч

3. Установка пороговых значений (Thresholds):

3.1. В случае использования калибровочного файла для исследования питьевой воды параметры пороговых значений вносятся автоматически (имеется коммерческий калибровочный файл для исследования питьевой воды на колиформные бактерии – COLI.COR).

3.2. В отсутствие калибровочного файла одновременно с посевом исследуемого образца воды на среду BiMedia 160 B производит-

* Возможно использование питательной среды BiMedia 160 C при необходимости определения индолообразования.

ся определение наличия колиформных бактерий классическим методом мембранных фильтров в соответствии с МУК 4.2.1018—01.

Результаты, полученные при классическом методе исследования, вносят в соответствующий файл (MAIN MENU / DATA FUNCTION / ENTER VALUES). Основные этапы создания калибровочного файла рассмотрены в разделе 5 данных указаний.

4. Добавить в каждую измерительную ячейку по 10 мл среды BiMedia 160 B.

5. Поместить мембранный фильтр исследуемого образца воды в измерительную ячейку с 10 мл среды.

6. Для контроля среды используют измерительную ячейку с 10 мл среды BiMedia 160 B.

7. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерение.

8. После того, как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

При наличии в исследуемом образце воды единичных клеток колиформных бактерий изменение сигнала импеданса превышает 5 %-ное пороговое значение по М-параметру за период времени менее 16 часов.

При положительном результате наблюдается также изменение цвета питательной среды: исходный пурпурный цвет среды меняется на желтый.

При использовании калибровочного файла результат исследования выдается автоматически в виде количества колиформных бактерий в исследуемом объеме воды.

Для постановки оксидазного теста и определения ферментации лактозы при (44 ± 0,5) °С с целью подтверждения наличия или отсутствия термотолерантных колиформных бактерий в исследуемой пробе из ячеек с признаками роста колиформных бактерий делают высев петлей на чашки Петри со средой Эндо. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ± 2 часов.

Постановка тестов проводится в соответствии с требованиями МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

4.2.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий прямым методом с использованием измерительных ячеек объемом 100 мл

1. Концентрированная среда BiMedia 160 B (5-кратной концентрации)*.

2. Протокол измерения.

2.1. Установить температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters)

Время исследования (Duration) – 24 ч

Масштаб измерений (Scale):

- М-параметр 0—50 %
- Е-параметр 0—50 %

Время задержки (Delay) 1 ч

3. Установка пороговых значений (Thresholds):

3.1. В случае использования калибровочного файла для исследования питьевой воды параметры пороговых значений вносятся автоматически (имеется коммерческий калибровочный файл для исследования питьевой воды на колиформные бактерии – COLI.COR).

3.2. В отсутствие калибровочного файла одновременно с посевом исследуемого образца воды на среду BiMedia 160 B производится определение колиформных бактерий классическим методом мембранных фильтров в соответствии с МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

Результаты, полученные при классическом методе исследования, вносят в соответствующий файл (MAIN MENU / DATA FUNCTIONS / ENTER VALUES). Основные этапы создания калибровочного файла рассмотрены в разделе 5 данных указаний.

4. Поместить 100 мл исследуемого образца воды в измерительную ячейку прибора объемом 100 мл.

5. Добавить в каждую измерительную ячейку по 20 мл концентрированной среды BiMedia 160 B.

6. Для контроля среды используют одну измерительную ячейку со 100 мл стерильной дистиллированной воды и 20 мл концентрированной среды BiMedia 160 B.

7. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерения.

---

* Для приготовления концентрированной среды навеска сухого препарата среды увеличивается в 5 раз, а объем дистиллированной воды остается прежним.

8. После того, как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

При наличии в исследуемом образце воды единичных клеток колиформных бактерий изменение сигнала импеданса превышает 5 %-ное пороговое значение по М-параметру менее чем за 16 часов.

При положительном результате наблюдается также изменение цвета питательной среды с исходного пурпурного до желтого.

При использовании калибровочного файла результат исследования выдается автоматически в виде количества колиформных бактерий в исследуемом объеме воды.

Из ячеек с признаками роста колиформных бактерий делают высев петлей на чашки Петри со средой Эндо для постановки оксидазного теста и определения ферментации лактозы при (44 ± 0,5) °С с целью подтверждения наличия или отсутствия термотолерантных колиформных бактерий в исследуемой пробе. Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Постановка тестов проводится в соответствии с МУК 4.2.1018—01.

4.2.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

Определение колиформных бактерий титрационным методом проводится в соответствии с МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» на приборе после этапа подращивания засеянных объемов пробы анализируемой воды в средах накопления.

Сущность метода заключается в посеве определенных объемов анализируемой пробы воды в жидкую питательную среду для накопления бактерий с последующим высевом в измерительную ячейку прибора.

1. Среда BiMedia 160 B, приготовленная в соответствии с требованиями инструкции изготовителя.

2. Протокол измерения

2.1. Установить температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters):

Время исследования (Duration) – 24 ч

Масштаб измерений (Scale)

- М-параметр 0—50 %
- Е-параметр 0—50 %

Время задержки (Delay) 1 ч

3. Установка пороговых значений:

Пороговые значения (Thresholds)

- М-параметр 5 %
- Е-параметр 10 %

Проводить учет результатов по М-параметру.

Пороговое значение по времени (Time limit) – 3 ч.

4. Добавить в каждую измерительную ячейку по 9 мл среды BiMedia 160 B.

5. Внести 1 мл из каждого объема с признаками роста в среде накопления в 9 мл среды BiMedia 160 B.

6. Для контроля среды использовать одну измерительную ячейку с 10 мл среды BiMedia 160 B (без инокулята).

7. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерения.

8. После того, как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

При наличии в засеянных после накопления объемах колиформных бактерий сигнал импеданса превышает 5 %-ное пороговое значение по М-параметру в течение 3 ч.

При положительном результате наблюдается также изменение цвета питательной среды с исходного пурпурного на желтый.

Для постановки оксидазного теста и определения ферментации лактозы при (44 ± 0,5) °С с целью подтверждения наличия или отсутствия термотолерантных колиформных бактерий в исследуемой пробе из засеянных объемов с признаками роста в среде накопления делают высев петлей на среду Эндо. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (18—20) ч.

Постановка тестов проводится в соответствии с МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

Для ускорения получения результатов на присутствие термотолерантных колиформных бактерий допустимо проводить высев 1 мл из объема среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование, в измерительную ячейку «Бак Трак» с 9 мл среды BiMedia

160 В и инкубировать при режиме (44 ± 0,5) °С по вышеописанному протоколу измерения.

Учет результатов титрационного метода ведется в соответствии с МУК 4.2.1018—01, раздел 8.3.5.

4.3. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий

Сущность метода заключается в концентрировании определенного объема исследуемого образца воды с использованием мембранных фильтров и последующем тестировании на приборе «Бак Трак».

1. Среда BiMedia 660 A (готовится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя).

2. Протокол измерения:

2.1. Установить температуру 43 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters):

Время исследования (Duration) – 24 ч

Масштаб измерений (Scale):

- М-параметр 0—50 %
- Е-параметр 0—50 %

Время задержки (Delay) 1 ч

Пороговые значения (Thresholds):

- М-параметр 5 %
- Е-параметр 10 %

Проводить учет результатов по М-параметру.

Пороговое значение по времени (Time limit) – 23 часа.

Определение сульфитредуцирующих клостридий необходимо проводить, используя измерительные ячейки для анаэробов.

3. Добавить в каждую измерительную ячейку по 10 мл питательной среды BiMedia 660 A.

4. Отфильтровать соответствующее количество исследуемого образца воды (20 мл), в котором не допускается наличия спор сульфитредуцирующих клостридий, и поместить фильтр в измерительную ячейку со средой.

5. Для контроля питательной среды используют одну измерительную ячейку с 10 мл среды BiMedia 660 A.

6. Поместить измерительные ячейки с образцами исследуемых проб воды и контролем питательной среды в штатив и прогреть на водяной бане при температуре (75 ± 5) °С в течение 15 мин.

7. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерения.

8. После того, как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

Учет результатов

Образец загрязнен спорами сульфитредуцирующих бактерий, если изменение импеданса превышает 5 %-ное пороговое значение по М-параметру и 10 %-ное пороговое значение по Е-параметру в течение 23 часов.

При положительном результате на стенках измерительной ячейки должен обнаруживаться выпавший осадок черного цвета.

Примечания:

Определение возможно проводить, используя обычные измерительные ячейки и парафиновое масло.

Для этого необходимо добавить в каждую измерительную ячейку по 9 мл питательной среды BiMedia 660 A и 1 мл парафинового масла (как покрывающий слой) и автоклавировать ячейки с внесенной в них питательной средой и парафиновым маслом (крышки должны быть приоткрыты!).

4.4. Прямой метод определения колифагов

Определение колифагов в воде проводится в измерительных ячейках объемом 100 мл.

1. Среда BiMedia 001 A десятикратной концентрации*.

2. Протокол измерения:

2.1. Установить температуру 37 °С на приборе «Бак Трак».

2.2. Установить в основном меню программы прибора параметры.

Параметры для инкубаторного блока (Adjust parameters):

Время исследования (Duration) – 24 ч

Масштаб измерений (Scale):

- М-параметр 0—50 %
- Е-параметр 0—50 %

Время задержки (Delay) 1 ч

Пороговые значения (Thresholds):

- М-параметр 5 %
- Е-параметр 10 %

Учет результатов проводится по М-параметру.

---

* Для приготовления концентрированной среды навеска сухого препарата среды увеличивается в 10 раз, а объем дистиллированной воды остается прежним.

3. Отфильтровать 100 мл исследуемой пробы воды через фильтр для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм.

4. Фильтрат поместить в измерительную ячейку с 10 мл концентрированной среды BiMedia 001 A.

5. Внести 1 мл, 0,1 мл и 0,01 мл свежей ночной культуры чувствительного к фагу штамма E. coli* в измерительные ячейки с отфильтрованными образцами воды.

6. Для контроля использовать измерительные ячейки со 100 мл стерильной воды + 10 мл концентрированной среды BiMedia 001 A + ночная культура чувствительного к фагу штамма E. coli (1 мл, 0,1 мл, 0,01 мл).

7. Выбрать в основном меню программы ЗАПУСК ИЗМЕРЕНИЙ (START MEASUREMENT) и начать измерение.

8. После того, как каждая позиция блока будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в прибор «Бак Трак».

Измерение начнется автоматически через 1 час после загрузки ячеек в прибор.

9. Оценка результатов:

• при отсутствии колифагов в воде время детекции импеданса (IDT) будет одинаковым как для исследуемого, так и для контрольного образца (при сравнении одинакового количества внесенной культуры E. coli);

• при наличии колифагов в воде время детекции импеданса (IDT) для исследуемых образцов будет больше по сравнению с контролем (при сравнении одинакового количества внесенной культуры E. coli). Изменится также форма кривой импедансного сигнала.

Примечание. *Использование различных количеств тест-культуры E. coli рекомендуется только для начального этапа отработки и нахождения оптимальной плотности культуры. В дальнейших исследованиях возможно использование лишь оптимального количества вносимой культуры. Рекомендуется не превышать показатель 100—1000 клеток E. coli в измерительной ячейке.*

5. Основные этапы создания калибровочного файла

Для создания калибровочного файла необходимо исследовать не менее 50 проб воды централизованных систем питьевого водоснабжения параллельно двумя методами: классическим и с помощью прибора «Бак Трак».

---

* Наименование тест-культуры и подготовка ее для использования в методике определения колифагов указаны в соответствующих разделах МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

Для этого необходимо:

1. В основном меню программы «Бак Трак» MAIN MENU в разделе «Задание пороговых значений» (THRESHOLDS) не указывать пороговые значения (NONE).

2. Провести исследование проб воды с использованием прибора в соответствии с требованиями данных указаний и параллельные исследования этих же проб классическим методом по МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

3. Результаты классического метода исследования занести в соответствующий файл данных программы «Бак Трак».

Для этого:

3.1. В основном меню программы «Бак Трак» выбрать раздел «Работа с данными» (Data Functions).

3.2. В меню Data Functions выбрать соответствующие файлы исследования проб воды в разделе «Выбор файлов» (Select files).

3.3. Внести в меню «Data Functions» в разделе «Ввод численных значений» (Enter Values) результаты для соответствующих исследованных проб воды.

4. После того, как будет получено не менее 50 результатов исследования двумя параллельными методами – классическим и автоматическим с помощью прибора «Бак Трак» – можно приступать к созданию калибровочного файла.

5. Основные этапы создания калибровочного файла

5.1. В основном меню программы «Бак Трак» выбрать раздел «Работа с данными» (Data functions).

5.2. В меню «Работа с данными» (Data functions) выбрать соответствующие файлы исследования (не менее 50 проб) питьевой воды в разделе «Выбор файлов» (Select files).

5.3. В меню «Работа с данными» (Data functions) выбрать раздел «Построение калибровочного файла» (Correlation).

5.4. Указать «Пороговое значение» (Thresholds) для М-параметра или Е-параметра, по которому будет проводиться построение калибровочной кривой. Как правило, для построения калибровочной кривой используется М-параметр, численное значение которого 5 %.

5.5. После задания порогового значения М-параметра необходимо вычислить корреляцию (Calculate).

5.6. Если коэффициент корреляции **r** превышает значение (–0,85), то данная калибровочная кривая показывает высокую степень корреляции и отвечает требованиям (рис. 5.1, 5.2).

5.6.1. Указать «Пороговое значение по времени» (Time-Limits). Для этого в полученное уравнение регрессии (уравнение калибро-

вочной кривой) необходимо подставить максимально допустимое значение определяемого показателя (ОМЧ, колииндекс и т. д.), регламентированное в данном случае СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Далее следует вычислить логарифм определяемого показателя и определить из уравнения значение времени – (t). Это и есть величина «Порогового значения по времени» – Time Limits.

```
File:                Text:
Threshold M:    5 %    Threshold E:   10 %    In Use: M-Value
  No Limits
Correlation: log(CFU) = -0.1722 * t + 3.6434    correlationfactor: r = -0.9811
Dispersion: Syx = 0.1381

104 files used for correlation
```

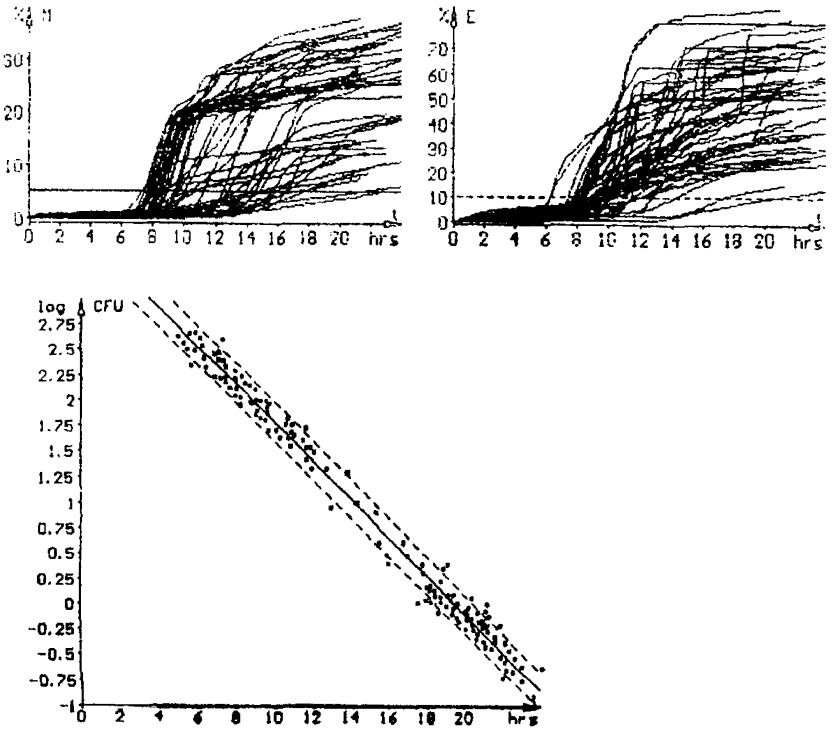


Рис. 5.1. Корреляция между логарифмом численности микроорганизмов – log КОЕ (CFU) и временем определения импеданса — t для образцов питьевой воды с использованием среды BiMedia 001 A.

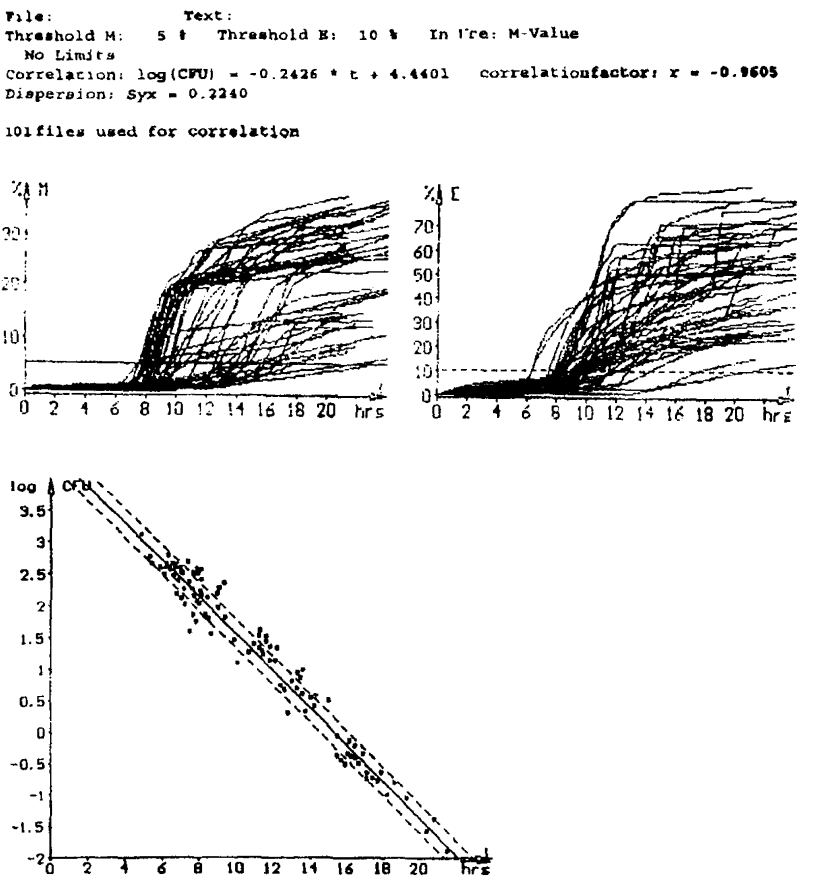


Рис. 5.2. Корреляция между логарифмом численности микроорганизмов – log КОЕ (CFU) и временем определения импеданса — t для образцов питьевой воды с использованием среды BiMedia 160 B.

5.6.2. Теперь данная калибровочная кривая записывается на диск (Disk) в виде калибровочного файла (Filename).

5.6.3. При необходимости вносится дополнительный комментарий (Comment) для детального описания калибровочного файла.

5.7. Если коэффициент корреляции r не превышает (–0,85), то необходимо более детально проанализировать полученную зависимость. Как правило, прослеживается общая тенденция: большинство точек

находится вблизи калибровочной кривой, и имеются лишь отдельные «точки-выбросы», которые расположены вдали от калибровочной кривой (рис. 5.3). В этом случае необходимо «точки-выбросы» исключить. Это приведет к существенному повышению коэффициента корреляции r.

```
File:                Text:
Threshold M:    5 %    Threshold E:   10 %    In Use: M-Value
  No Limits
Correlation: log(CFU) = -0.1088 * t + 2.4978 correlationfactor: r = -0.7249
Dispersion: Syx = 0.4738

53 files used for correlation
```

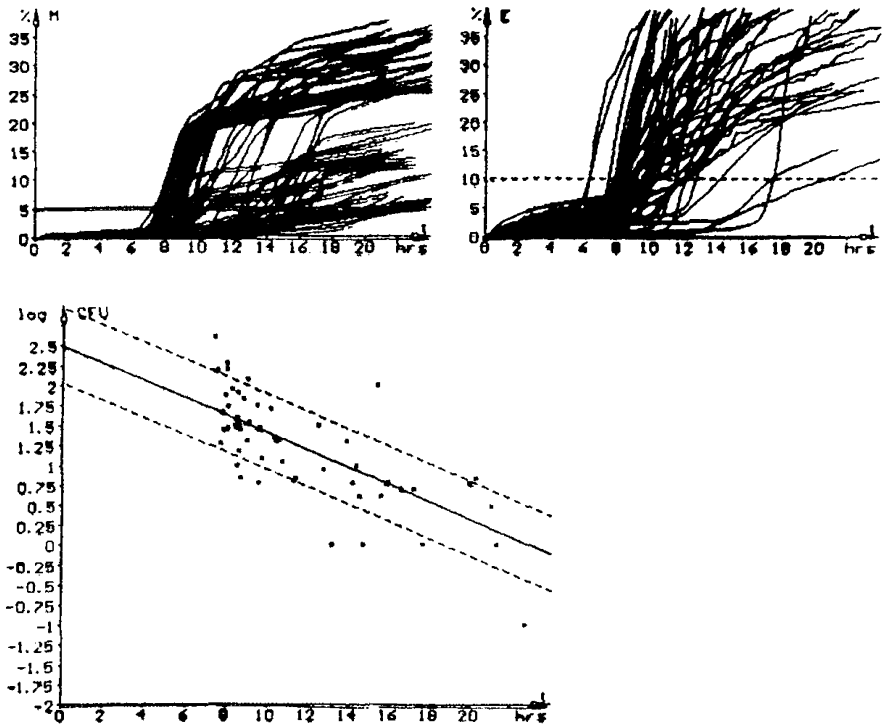


Рис. 5.3. «Точки-выбросы», располагающиеся вдали от калибровочной кривой, снижают коэффициент корреляции.

6. После создания калибровочного файла необходимо выбрать данный файл при задании пороговых значений (Thresholds) в главном меню программы «Бак Трак» для автоматического подсчета величины определяемого показателя.

6. Питательные среды: назначение, приготовление, использование

Питательные среды, используемые в импедансной микробиологии, специально разработаны фирмой SY-LAB (Австрия)* для системы «Бак Трак». Селективность фирменных питательных сред позволяет определять микробиологические показатели качества питьевой воды систем централизованного водоснабжения в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

Эти среды обладают всеми свойствами, необходимыми для измерения импеданса:

- ровная базовая линия с небольшим или нулевым дрейфом или шумом в присутствии инокулюма;
- высокая начальная скорость изменения электрического сигнала, дающая резкий перегиб в точке определения;
- большая величина тотальных электрических изменений.

Для санитарно-микробиологического анализа питьевой воды используются следующие питательные среды:

- BiMedia 001A – для определения общего числа микроорганизмов;
- BiMedia 160B и 160C – для определения колиформных бактерий;
- BiMedia 660A – для определения сульфитредуцирующих клостридий.

6.1. Приготовление сред

6.1.1. *BiMedia 001A* – для определения мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (общее число микроорганизмов) и BiMedia 160B – для определения колиформных бактерий (общих и термотолерантных):

- растворить необходимое количество среды в дистиллированной воде (соотношение указано на упаковке),
- разделить приготовленную среду на порции и автоклавировать при 1 атм. 15 мин,

* Питательные среды BiMedia 001A и BiMedia 160B выпускаются также Отделением питательных сред Государственного научного центра прикладной микробиологии (Московская область, г. Оболенск).

• после стерилизации среда должна уравновеситься при комнатной температуре в течение 6 ч.

Примечание. *Приготовленная среда должна храниться при температуре 4 °С. Срок хранения – 3 недели. Изменение режима стерилизации (более продолжительное автоклавирование) снижает качество среды!*

6.1.2. Приготовление среды *BiMedia 660A* — для определения сульфитредуцирующих клостридий:

• растворить все содержимое упаковки в дистиллированной воде (конечный объем — 1,2 или 5 л указан на этикетке);

• проверить pH среды и, если необходимо, довести до 7,1 ± 0,1;

• разлить приготовленную среду на порции и стерилизовать при 1 атм. 15 мин;

• дать среде уравновеситься в течение 12 ч при комнатной температуре перед использованием;

• внести по 9 мл среды в стерильные измерительные ячейки и поместить ячейки в штатив;

• прогреть измерительные ячейки (с приоткрытыми крышками) при 95—100 °С на пару в течение 15 мин (для удаления растворенного в среде кислорода);

• дать среде остыть до 50 °С (или меньше), затем можно добавлять аддитив;

• добавить во флакон с Аддитивом 660А 1,5 мл стерильной дистиллированной воды;

• добавить по 30 мкл раствора аддитива в каждую измерительную ячейку с 9 мл среды.

Для предотвращения образования воздушных пузырьков не погружайте наконечники пипетки в среду.

Примечание. *Аддитив необходимо добавлять только непосредственно перед использованием среды. Хранить аддитив при 4 °С.*

Растворы аддитивов следует хранить не более 2 недель.

Приготовленная среда должна храниться при 4 °С не более 2 недель.

Длительное прогревание и обработка при температуре выше рекомендуемой снижают качество среды!

7. Методика тестирования и обработки измерительных ячеек

7.1. Методика тестирования измерительных ячеек прибора «Бак Трак»

Необходимо каждые несколько месяцев проводить тестирование используемых измерительных ячеек для контроля регистрируемых показателей – изменения проводимости среды (М-параметр) и изменения проводимости электродов (Е-параметр).

Для этого необходимо:

1. В стерильные измерительные ячейки налить 10 мл или 100 мл стерильного физиологического раствора (в зависимости от объема ячеек).

2. Установить время исследования (Duration) – 24 ч.

3. Установить пороговое значение (Threshold) для М-параметра – 5 %.

4. Установить значение Time limit – 23 ч.

5. Начать измерение (Start measurement).

6. После того, как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная (Empty), поместить в инкубаторный блок измерительные ячейки с физиологическим раствором.

Учет результатов тестирования.

Если за время тестирования измерительных ячеек значения М-параметра не превысили 5 %, то ячейки пригодны для дальнейшей работы.

Если за время тестирования в ячейках значение М-параметра превысило 5 %, то цвет ячейки на экране монитора изменится на красный, что означает «проба загрязнена» (Contaminated). В этом случае необходимо повторно тестировать такую ячейку, предварительно поместив ее в любое другое место в инкубаторном блоке. При повторном получении аналогичных результатов (пересечение 5% значения М-параметра) необходимо заменить измерительные ячейки на новые.

7.2. Методика обработки измерительных ячеек прибора «Бак Трак»

7.2.1. Обработка измерительных ячеек

1. Приоткрыть пластиковые крышки измерительных ячеек и поместить измерительные ячейки в металлический штатив. Не автоклавировать плотно закрытые ячейки!

2. Стерилизовать измерительные ячейки при 1 атм. в течение 20—30 мин.

3. При наличии патогенных микроорганизмов — использовать режимную стерилизацию.

4. После автоклавирования дать ячейкам остыть до комнатной температуры.

5. Открыть измерительные ячейки и промыть их дистиллированной водой.

6. Если исследуемый продукт имел жирную консистенцию, то выдержать ячейки в растворе с мягким нейтральным моющим средством (например, хозяйственное мыло) в течение 30 мин.

7. При необходимости промыть измерительные ячейки мягким ершиком так, чтобы не повредить электроды.

8. Если на дне измерительной ячейки остался какой-либо осадок, то его необходимо удалить.

9. Тщательно промыть измерительные ячейки 3 раза водопроводной водой и 2 раза дистиллированной водой.

10. Если между уплотнительными кольцами в донной крышке появилась вода, то необходимо разобрать измерительные ячейки и просушить их в разобранном виде в сушильном шкафу при 60 °С в течение 40 мин.

11. Собрать ячейки, верхнюю крышку плотно не закрывать!

12. Измерительные ячейки автоклавировать при 1 атм. в течение 15 мин.

Теперь измерительные ячейки готовы к использованию.

Примечание. *Никогда не используйте моющие средства, содержащие хлор. Тщательно промывайте ячейки, поскольку образование пленок на поверхности электродов вызывает шумы при прохождении сигнала.*

7.2.2. Стерилизация измерительных ячеек

1. Приоткрыть пластиковые крышки измерительных ячеек.

2. Поместить измерительные ячейки в металлический штатив.

Не автоклавировать плотно закрытые ячейки!

3. Разместить штатив с измерительными ячейками в верхней части автоклава для предотвращения попадания воды в ячейки.

4. Стерилизовать измерительные ячейки при 1 атм. в течение 20 мин.

Никогда не стерилизовать ячейки в сухожаровом шкафу!

5. Достать измерительные ячейки из автоклава, как только это станет возможным (≈ 70—85 °С).

Высушить ячейки при комнатной температуре.

6. Если между уплотнительными кольцами в донной крышке появилась вода, то необходимо разобрать измерительные ячейки и

высушить их в разобранном виде в сушильном шкафу при 60 °С в течение 40 мин.

7. Убедитесь, что ячейки полностью высохли. При необходимости просушите измерительные ячейки еще раз.

Теперь измерительные ячейки готовы к использованию.

Примечание. *Возможна стерилизация измерительных ячеек с внесенной в них питательной средой.*

Библиографические данные

1. Водный кодекс Российской Федерации от 16.11.95.

2. Руководство по контролю качества питьевой воды.—Женева: ВОЗ, 1994—Т. 1.

3. Временные методические рекомендации по использованию питательных сред, предназначенных для микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100».—М., 1995.

4. Методические рекомендации по проведению бактериологических исследований питьевой воды с использованием микробиологического экспресс-анализатора «Бак Трак 4100».—М., 1996.

5. Подунова Л. Г., Кривопалова Н. С., Сорокина Р. С. и др. Экспресс-метод бактериологического контроля за качеством питьевой воды /Стендовый доклад II Международного конгресса «Вода: Экология и технология» ЭКВАТЭК—96.— М., 1996.

6. Определитель бактерий Берджи /Под редакцией Дж. Хоулта., Н. Крига, П. Снита. Дж. Стейли и С. Уилльямса.—М.: «Мир», 1997.—Т. 1.

7. Аганов А. Н., Белова М. А., Гумен С. Г. Применение системы «Бак Трак 4100» //Водоснабжение и санитарная техника.—1998, № 10.—С. 25—27.

8. Недачин А. Е., Артемова Т. З., Талаева Ю. Г., Рахманин Ю. А. и др. //Тезисы докладов IV Международного конгресса «Вода: Экология и технология» ЭКВАТЭК—2000.—М., 2000.—С. 760—761.

9. Пивоваров Ю. П., Королик В. В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация).— М., 2000.

10. Noble P. A., Ashton E., Davidson C. A., Albritton W. L. Heterotrophic plate counts of surface water samples by using impedance methods. Applied and Environmental Microbiology 57 (11), 1991.—С. 3287—3291.

11. Futschik K. Bac Trac 4100 Impedance-splitting method //Technical University of Vienna, Institute of Electrotechnical Principles and Theory, 1992.—P. 1—8.

12. Denner E. B. M. The BacTrac 4100, a New Impedance Measuring System for the Rapid Detection of Microorganisms //BACTRAC Seminar.—Moscow, October, 1995.—P. 1—31.

13. Colquhoun K. O., Timms S., Fricker C. R. Detection of Escherichia coli in potable water using direct impedance technology //Journal of Applied Bacteriology, 1995, 79.—P. 635—639.

14. Futschik K., Pfutzner H., Nussbaaum C. Selective detection of microorganisms by use of electrode impedance //IX International conference on electrical bio-impedance. September 26—30, 1995.—Heidelberg, Germany.—P. 79—82.

Приложение

Форма кривых импедансного сигнала при исследовании питьевой воды с использованием различных питательных сред

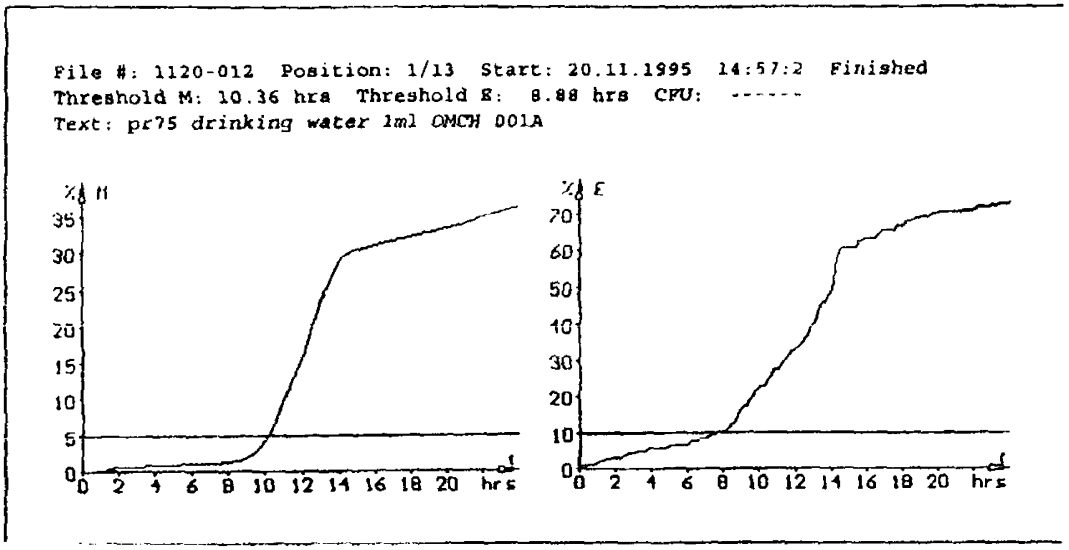


Рис. 1. Типичная кривая импедансного сигнала при определении общего количества микроорганизмов (TVC) с использованием питательной среды BiMedia 001A.

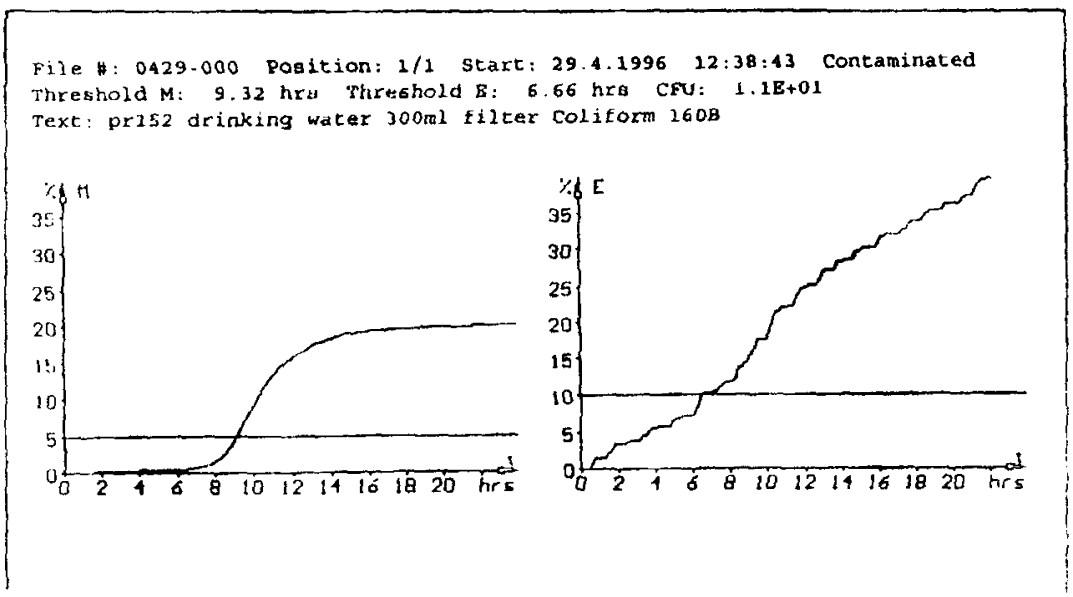


Рис. 2. Типичная кривая импедансного сигнала при определении колиформных бактерий методом мембранных фильтров с использованием питательной среды BiMedia 160B.

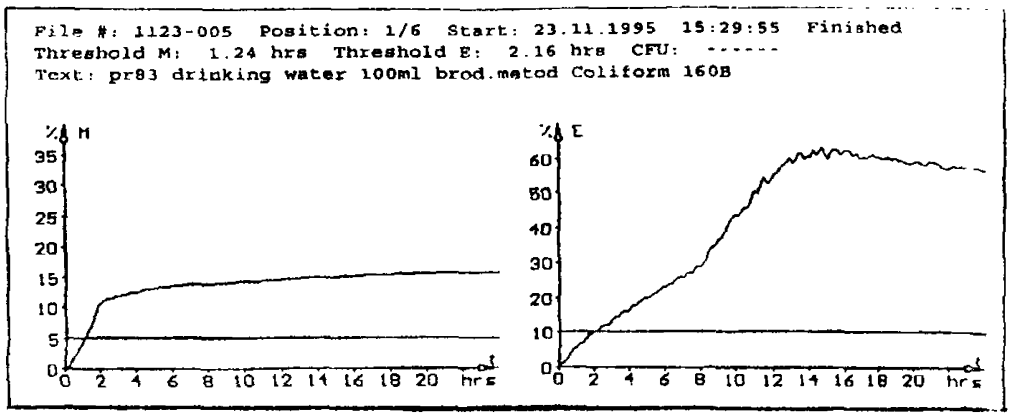


Рис. 3. Типичная кривая импедансного сигнала при определении колиформных бактерий с использованием этапа подращивания в средах накопления и последующем исследовании на приборе в среде BiMedia 160B.

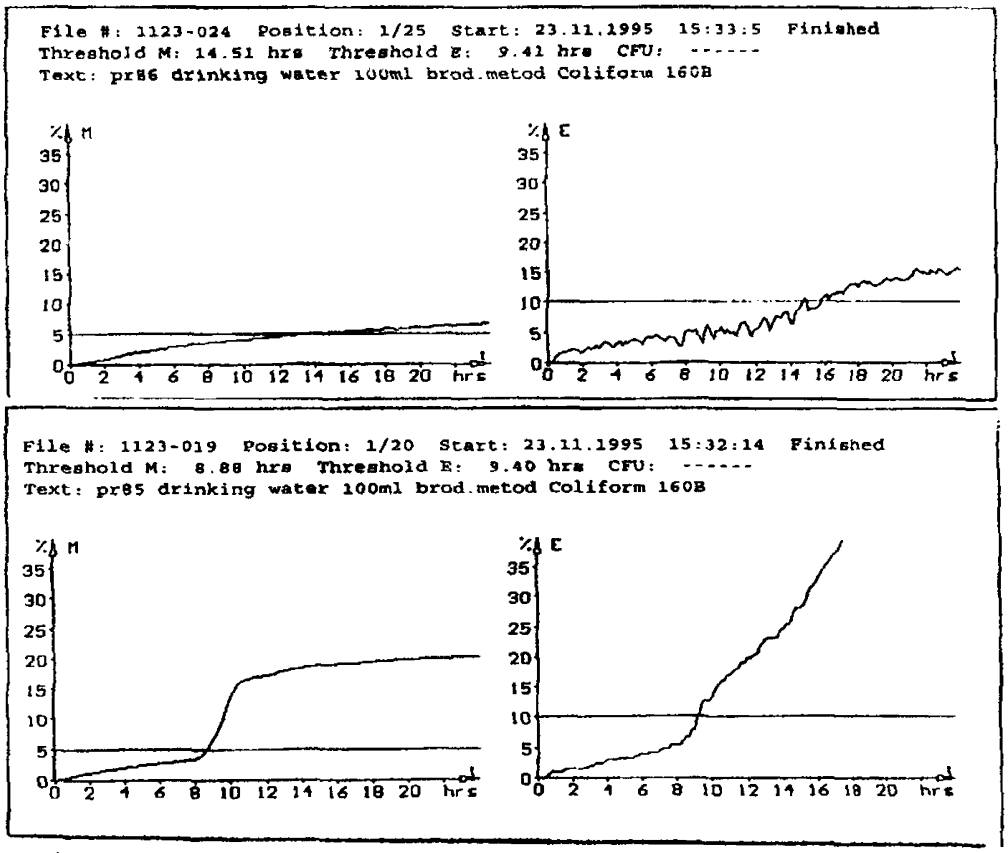


Рис. 4, 5. Атипичные кривые импедансного сигнала при определении колиформных бактерий с использованием этапа подращивания в средах накопления и последующем исследовании на приборе в среде BiMedia 160B.

gost.e-ecolog.ru