МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Полевые методы санитарно-микробиологического анализа

ГОСТ 24849—81

Potable water. Field methods of sanitary and microbiological analysis

Дата введения 01.07.82

Настоящий стандарт распространяется на воду, используемую для хозяйственно-питьевых целей, и устанавливает полные, сокращенные и сигнальные методы определения числа сапрофитов и бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в полевых условиях, когда доставка проб в стационарную лабораторию невозможна в течение 6 ч после отбора. Когда доставка проб в стационарную лабораторию возможна в течение 6 ч, анализ проводят по ГОСТ 18963.

Термины, употребляемые в стандарте, и их определения даны в приложении 2.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Место отбора проб определяют в зависимости от источника водопользования. При контроле качества воды в системе централизованного водоснабжения пробы воды отбирают после предварительной стерилизации кранов обжиганием и последующего спуска воды в течение 1—10 мин при полностью открытом кране.

При контроле качества воды водоисточников децентрализованного водоснабжения (колодцев, каптажей, родников и т. д.), если отсутствуют механизированная подача воды и сливные трубы, пробы воды отбирают батометром.

1.2. Пробы воды отбирают в стерильную посуду стерильными батометрами; руки перед отбором обеззараживают. Посуду открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и горлышко не должны касаться нестерильных предметов. Ополаскивать посуду не следует. Посуду с отобранной пробой немедленно после отбора закрывают стерильной пробкой, затем стерильным прочно фиксированным колпачком. Посуду с пробами воды, подлежащими транспортированию, закрывают пробками, не впитывающими воду (например, притертыми стеклянными, резиновыми, ватными, обернутыми фольгой и т. п.).

Если отбирают воду после обеззараживания, необходимо нейтрализовать остаточные количества дезинфектанта. При отборе хлорированной воды в посуду до ее стерилизации вносят серноватистокислый натрий из расчета 8—10 мг на 500 $см^3$ пробы.

Издание официальное ★ Перепечатка воспрещена

gost.e-ecolog.ru

1.3. Отобранную пробу сопровождают документом с указанием цели исследования, времени и места отбора. При отборе проб воды из источников децентрализованного водоснабжения дополнительно указывают погодные условия, температуру воды, санитарное состояние водоисточника и т.п.

1.4. Проба воды должна быть исследована в течение 2 ч после ее отбора. Допускается хранение пробы и ее транспортирование не более 6 ч при температуре 1—10 °С. При отсутствии холодильных приборов (холодильников, сумок-холодильников, термоконтейнеров и т. п.) пробы воды следует сохранять при температуре, которую вода имела во время отбора, предохраняя от замерзания, действия прямых солнечных лучей, перегрева и т. п.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы для передвижной лаборатории

Термостат, обеспечивающий температуру (37±2) °С.

Термостат, обеспечивающий температуру (44±0,5) °С.

Автоклав, обеспечивающий стерилизацию при (126±2) °С в течение 1 ч.

Сушильный шкаф, обеспечивающий температуру 160 °С в течение 1 ч.

Нагревательный прибор для варки сред из сухих препаратов, кипячения мембранных фильтров, расплавления питательного агара.

Холодильник портативный (автомобильный типа ХАТЭ-12 или термоконтейнер с емкостями для горячей воды или льда).

Весы равноплечие ручные (аптечные).

Спиртовки.

Штативы для пробирок.

Часы сигнальные или песочные по ОСТ 25—11—38.

Прибор для фильтрования под вакуумом, с диаметром фильтрующей поверхности 32 мм, с устройством для создания вакуума и фильтрования до 300 $см^3$ воды (насос типа Шинца, шприц и т. п.).

Лупа с увеличением $2^{\times}$ по ГОСТ 25706.

Микроскоп биологический с иммерсионным объективом, обеспечивающий увеличение не менее $630^{\times}$, и осветителем.

Прибор для окраски предметных стекол или ванночка эмалированная с мостиком.

Пинцеты.

Петли бактериологические.

Ножницы.

Вата хлопчатобумажная гигроскопическая медицинская по ГОСТ 5556.

Батометр.

Фильтры мембранные со средним диаметром пор 0,5 мкм и планктонные с диаметром пор 3—5 мкм; диаметр диска 35 мм.

Бумага фильтровальная.

Посуда для кипячения мембранных фильтров (эмалированная кружка или кастрюля с крышкой).

Стекла предметные.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Карандаши по стеклу.

Спички по ГОСТ 1820.

Лабораторный журнал для записи результатов анализа.

Посуда для отбора проб вместимостью 500 $см^3$ с притертыми резиновыми или ватными пробками, обернутыми фольгой.

Чашки Петри.

Пробирки бактериологические.

Пипетки прямые, вместимостью 1 и 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ на полный слив по ГОСТ 29227.

Цилиндры или мензурки по ГОСТ 1770.

Посуда стеклянная или эмалированная для приготовления сред.

Реактивные полоски для образования индола.

Бумажки для окраски по Граму, приготовленные по ГОСТ 18963.

Раствор Люголя, приготовленный по ГОСТ 18963.

Триптофан.

Натрий серноватистокислый по ГОСТ 27068.

Агар сухой питательный.

Среда Эндо сухая питательная.

Сухой препарат с индикатором ВР и глюкозой.

Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой.

Спирт этиловый ректификованный 96 %-ный по ГОСТ 5962*.

Жидкость горючая для спиртовок (спирт гидролизный и др.).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Реактивы для оксидазного теста: диметил-*п*-фенилендиамин солянокислый или любое другое фенилендиаминовое соединение, α-нафтол по ТУ 6—09—5417 (могут быть заменены бумажными индикаторными системами на оксидазу).

Фуксин основной, 10 %-ный спиртовой раствор, со сроком хранения не более 1 мес.

Кислота розоловая, 5 %-ный спиртовой раствор, со сроком хранения не более 1 мес.

Фенол по ТУ 6—09—5303, 5 %-ный водный раствор, со сроком хранения не более 1 мес.

2.2. Аппаратура, материалы и реактивы для переносной лаборатории при доставке посевов в стационарную лабораторию

Термостат переносной для работы в движении, обеспечивающий температуру (37±2) °С, или термоконтейнер.

Прибор для фильтрования под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 32 мм и с приспособлением для создания вакуума.

Спиртовка металлическая с подставкой.

Штатив для пробирок, при необходимости приготовления разбавлений.

Пинцет.

Фильтры мембранные стерильные со средним диаметром пор 0,5 мкм и планктонные с диаметром пор 3—5 мкм; диаметр диска 35 мм.

Вата хлопчатобумажная гигроскопическая медицинская.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Жидкость горючая (спирт гидролизный и др.).

Посуда для отбора проб.

Батометр.

Чашки Петри стерильные, в пенале или обернутые в плотную бумагу.

Пипетки вместимостью 1 и 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ на полный слив по ГОСТ 29227.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000 (здесь и далее).

Пипетки капиллярные, вместимостью 0,1 $см^3$ с ценой деления 0,01 $см^3$ по ГОСТ 29227, при работе капельным методом.

Стерильные пробирки и стерильная вода для приготовления разбавлений.

Питательный агар, готовый к употреблению и разлитый в удобные для быстрого расплавления флаконы или пробирки.

Чашки Петри со средой Эндо, готовой к употреблению.

При невозможности укомплектовать лабораторию готовой средой Эндо ее приготовляют непосредственно перед испытанием.

Примечание. Среда Эндо может быть заменена сухими, приготовленными заранее питательными подкладками.

2.3. Аппаратура, материалы и реактивы для переносной лаборатории при выполнении анализа на месте отбора проб

Кроме оборудования по п. 2.2, применяют материалы и питательные среды, необходимые для дифференцирования БГКП и подсчета числа колоний на питательном агаре:

Лупа с увеличением 2× по ГОСТ 25706.

Петля бактериологическая.

Бумага фильтровальная стерильная, нарезанная кружочками диаметром, немного большим диаметра мембранного фильтра.

Реактивы для оксидазного теста (фильтровальная бумага и реактивы для оксидазного теста могут быть заменены готовой бумажной индикаторной системой на оксидазу).

Полужидкая среда с индикатором и глюкозой (может быть заменена бумажными углеводными дисками с глюкозой).

Сорбит для двууглеводной среды.

2.4. Аппаратура, материалы для лаборатории при выполнении анализа сигнальными методами (с помощью индикаторных полосок и среды КОДА)

2.4.1. Для проведения анализа с помощью индикаторных полосок необходимы:

Индикаторные питательные полоски.

Спиртовка.

Пинцет.

Предметные стекла 2 шт.

Термостат переносной с небольшой емкостью, обеспечивающий температуру (42±2) °С.

2.4.2. Для проведения анализа титрационным методом с использованием среды КОДА необходимы:

Нагревательный прибор для приготовления среды из сухого препарата.

Дистиллированная вода по ГОСТ 6709.

Посуда стеклянная или эмалированная для приготовления среды.

Флаконы вместимостью 100—200 $см^3$.

Пробирки бактериологические.

Штативы.

Сухой препарат среды КОДА.

Термостат, обеспечивающий температуру (37±2) °С.

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Подготовка лабораторной посуды и материалов

Посуду и материалы готовят к анализу в стационарной лаборатории в соответствии с требованиями ГОСТ 18963. Комплектуют лаборатории для

полевых исследований стерильной посудой и материалами в стерильной упаковке.

При невозможности комплектования лаборатории материалами на весь объем исследований можно проводить мытье, подготовку к стерилизации, стерилизацию посуды на месте (либо в автоклаве при (126±2) °С 30 мин, либо в сушильном шкафу при (160±5) °С в течение 1 ч). В этих случаях обеззараживание бактериологического материала проводят в автоклаве при (126±2) °С 30 мин или кипячением в течение 30 мин.

Для стерилизации прибора для фильтрования, пинцета, батометра, обработки рабочего места перед анализом применяют этиловый ректификованный спирт.

3.2. Приготовление сред и реактивов

3.2.1. Приготовление стерильной воды — по ГОСТ 18963.

3.2.2. Питательный агар готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке.

3.2.3. Полужидкую среду с глюкозой (лактозой) готовят из сухого препарата с индикатором ВР и глюкозой (лактозой) по способу, указанному на этикетке.

При приготовлении полужидкой среды с лактозой для определения бактерий — показателей свежего фекального загрязнения добавляют 0,05 г триптофана на 100 $см^3$ готовой среды перед разливом ее в пробирки.

3.2.4. Среду Эндо (модификацию) готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. В готовую и охлажденную до 60—70 °С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 $см^3$ среды: 0,2 $см^3$ 10 %-ного спиртового раствора основного фуксина для повышения дифференцирующих свойств среды и 0,2 $см^3$ 5 %-ного спиртового раствора розоловой кислоты во избежание зарастания посевов споровыми аэробными бактериями. После тщательного перемешивания среду разливают в чашки.

Среда не должна содержать следов влаги на поверхности. Чашки со средой хранят в светоизолированных укладках (пеналах) или заворачивают в плотную стерильную бумагу, не пропускающую свет. Срок хранения — не более 7 дней в условиях, обеспечивающих неизменный внешний вид среды и ее стерильность.

Среду Эндо непосредственно перед испытанием готовят в эмалированной или стеклянной посуде с крышкой или ватной пробкой. Для этого в оснащении лаборатории необходимы стерильные чашки Петри, навески из сухого препарата и соответствующий объем дистиллированной воды. Навески сухого препарата должны быть предохранены от влаги и света.

3.2.5. Приготовление двууглеводной среды Эндо для ускоренного метода определения БГКП

На 100 $см^3$ дистиллированной воды помимо сухого препарата вносят 1 г сорбита. После приготовления среды по способу, указанному на этикетке, допускается прибавить на 100 $см^3$ среды 0,2 $см^3$ 10 %-ного спиртового раствора основного фуксина, 0,4 $см^3$ 50 %-ного водного раствора фенола и 1,5 $см^3$ 96 %-ного этилового ректификованного спирта.

3.2.6. Приготовление реактива для определения оксидазной активности бактерий

1-й — 1 %-ный спиртовой раствор α-нафтола;

2-й — 1 %-ный водный раствор диметил-*п*-фенилендиамина солянокислого или другого фенилендиаминового соединения.

Растворы хранят в темных флаконах с притертыми пробками:

1-й — до одного месяца; 2-й — до одной недели.

Перед употреблением к трем частям 1-го раствора добавляют семь частей 2-го раствора.

3.2.7. Приготовление тетразолово-розоловой среды (ТРС) и питательных подкладок

100 $см^3$ мясопептонного бульона, 2 г лактозы, 0,25 г сухого питательного агара расплавляют при нагревании, стерилизуют при 112 °С 12 мин. Перед приготовлением подкладок в среду вносят 10 $см^3$ 2 %-ного водного раствора 2-,3-,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ), 2 $см^3$ 0,01 %-ного спиртового раствора розоловой кислоты. Средой пропитывают стерильные подкладки, вырезанные в виде дисков размером, несколько большим диаметра мембранного фильтра, из асбестовых фильтров типа Зейтца (Ф) или 6—8 слоев листовой фильтровальной бумаги.

Подкладки, залитые средой, пропитывают при осторожном нагревании до температуры не выше 60 °С на водяной бане в течение 3 ч. Затем подкладки высушивают при 45—50 °С в сушильном шкафу. Хранят в темноте в стерильных упаковках. Цвет подкладок должен быть соломенно-желтым.

3.2.8. Приготовление среды КОДА

Среду нормальной концентрации готовят по способу, указанному на этикетке, и разливают в пробирки по 9 $см^3$. Среду удвоенной концентрации готовят, увеличивая количество сухого препарата в два раза на тот же объем воды, и разливают по 10, 50, 100 $см^3$ во флаконы — в зависимости от выбранной схемы посева.

3.2.9. Приготовление реактивных полосок для определения образования индола

Реактивом, состоящим из 4 г *пара*-диметиламинобензальдегида, 50 $см^3$ 96 %-ного этилового спирта, 50 $см^3$ ортофосфорной кислоты (очищенной концентрированной), смачивают полоски из фильтровальной бумаги на $^1/_3$ их длины. Высушенные реактивные полоски можно сохранять в банке из темного стекла с притертой пробкой или в плотных пакетах из черной бумаги. Чувствительность полосок увеличится, если этиловый спирт заменить на амиловый или изоамиловый.

Цвет обработанного реактивом конца бумажки должен быть желтый.

3.2.10. Приготовление индикаторных питательных полосок для определения колииндекса сигнальным методом (при отсутствии готовых)

Для приготовления индикаторных полосок можно использовать хроматографическую бумагу массой 200 $г/см^3$, имеющую впитываемость по Клемму около 50 и состав по волокну 100 % тряпичной полумассы. Стерилизовать бумагу можно под бактерицидной лампой с каждой стороны по 30 мин.

Стерильную бумагу пропитывают в течение 3 ч стерильной питательной средой (на 100 $см^3$ мясопептонного бульона Хоттингера 2 г лактозы, 0,1 г агара и 11 $см^3$ 2 %-ного водного раствора ТТХ).

Бумагу сушат в сушильном шкафу при 40—50 °С, после чего нарезают полоски размером, обеспечивающим впитываемость 0,5—5 $см^3$ воды. Готовые индикаторные полоски имеют бледно-кремовый или слегка розовый цвет.

Хранят полоски в полиэтиленовых пакетиках, защищенных от света. Стерилизацию пакетиков проводят в 40 %-ном этиловом спирте в течение 2 сут с последующим высушиванием.

3.3. Флаконы и пробирки со средами должны быть закрыты ватными пробками, обернутыми фольгой, с бумажными колпачками, что предотвращает намачивание пробок при транспортировании и ограничивает высыхание сред. Стерильную воду, питательный агар можно хранить до тех пор, пока не уменьшится их объем. Предельный срок хранения полужидких сред с углеводами и индикатором — 40 дней, среды Эндо — 7 дней. Чашки со средой Эндо без следов влаги следует хранить в темноте.

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1. Выполнение полного анализа в передвижной лаборатории, монтируемой на специальных транспортных средствах (железнодорожных вагонах, автомобилях, судах и т. п.)

4.1.1. Определение числа сапрофитных микроорганизмов

К сапрофитным микроорганизмам относят мезофильных аэробных и факультативных анаэробов, способных расти на питательном агаре данного состава при температуре (37±2) °С в течение 24 ч, образуя колонии, видимые при увеличении в 2 раза.

4.1.1.1. Подготовка к анализу

Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, выбранных с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 20 до 300 колоний, при этом ориентируются на результаты предыдущих исследований.

При исследовании питьевой воды из системы централизованного водоснабжения в каждую из двух чашек вносят по 1 $см^3$ пробы без разбавления.

При исследовании воды неизвестной степени микробного загрязнения проводят посев 1 $см^3$ и по 1 $см^3$ из первого и второго десятикратных разбавлений.

4.1.1.2. Проведение анализа

После тщательного перемешивания пробы приготовляют разбавления и немедленно вносят по 1 $см^3$ воды из пробы или соответствующих разбавлений в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышку. Сразу же после внесения воды в каждую чашку вливают небольшое количество (5—6 $см^3$ на чашку диаметром 95 мм) расплавленного и остуженного до 45—48 °С питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он находился. Содержимое чашки быстро смешивают, равномерно распределяя его по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту операцию проводят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

Не допускается применять посев разбавлений, приготовленных заранее.

Чашки с посевами инкубируют вверх дном в термостате при температуре (37±2) °С в течение 24 ч.

4.1.1.3. Обработка результатов

Колонии подсчитывают только на чашках с числом изолированных колоний от 20 до 300. При посеве пробы без разбавления ведут подсчет на чашках с любым количеством колоний, меньшим 300. Должны быть подсчитаны все выросшие на чашке колонии, видимые при увеличении в 2 раза.

Число подсчитанных на каждой чашке колоний делят на объем воды в $см^3$, засеянный на ту чашку, на которой велся подсчет, и результат выражают в количестве колоний в 1 $см^3$ исследуемой воды. Вычисляют среднеарифметическое число колоний для всех чашек.

Окончательный результат округляют до двух-трех значащих цифр.

Результат можно представить на основании подсчета колоний на одной чашке, если на других чашках подвижный рост распространился на всю поверхность чашки или число колоний превышает 300—500.

Если на всех чашках наблюдается рост подвижных бактерий, не распространившийся на всю поверхность чашки, или в результате неудачной схемы посева в чашках с наиболее высоким разбавлением выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, допустимо вести подсчет с помощью счетной пластинки, разделенной на квадраты, или трафарета, делящего чашку на секторы. Подсчитывают не менее $^1/_4$ площади чашки в разных местах с последующим пересчетом на всю площадь чашки.

Если рост подвижных бактерий распространился на всю поверхность чашки, в протоколе анализа отмечают ползучий рост.

4.1.2. Определение числа бактерий группы кишечных палочек

К бактериям группы кишечных палочек относят: грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при (37±2) °С в течение 5—24 ч и с отрицательным оксидазным тестом.

При необходимости экстренного предварительного ответа бактерии группы кишечных палочек характеризуют по способности к ферментации лактозы до кислоты или кислоты и газа при температуре 37 °С в течение 16—18 ч.

4.1.2.1. Подготовка к анализу

При исследовании питьевой воды из системы централизованного водоснабжения анализируют 333 $см^3$, профильтровывая этот объем не менее чем через два фильтра.

При исследовании питьевой воды децентрализованного водоснабжения анализируют не менее 100 $см^3$ воды. Каждую пробу воды профильтровывают не менее чем через три фильтра (например, можно фильтровать по 100, 10 и 1 $см^3$).

При исследовании воды неизвестной степени бактериологического загрязнения профильтровывают не менее четырех десятикратных объемов воды как централизованного, так и децентрализованного водоснабжения. Объемы воды для посева выбраны правильно, если на одном-двух фильтрах выросли изолированные колонии, среди которых не более 30 колоний относятся к бактериям группы кишечных палочек.

4.1.2.2. Проведение анализа

Для фильтрования используют мембранные фильтры со средним диаметром пор 0,5 мкм. Сухие стерильные мембранные фильтры, заранее обработанные в стационарной лаборатории, перед фильтрованием смачивают в стерильной дистиллированной воде.

Фильтрование воды проводят по ГОСТ 18963.

Чашки с посевами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при (37±2) °С в течение 18—24 ч.

4.1.2.3. Обработка результатов

При отсутствии какого-либо роста на фильтрах или при наличии только пленчатых, губчатых с неровной поверхностью и краями, плесневых и других нехарактерных для кишечных палочек колоний дают отрицательный ответ. Анализ на этом заканчивают через 18—24 ч.

При росте на фильтрах колоний, характерных для кишечных палочек (темно-красных с металлическим блеском и без него, красных, розовых слизистых, розовых с темным центром, бесцветных) выполняют оксидазный

тест. Мембранный фильтр колониями вверх переносят на кружок фильтровальной бумаги, смоченной реактивом для определения оксидазной активности. Учитывая бактерицидность реактивов для определения оксидазной активности, мембранный фильтр сразу после проявления реакции следует перенести обратно на среду Эндо и не позднее 5—7 мин пересеять оксидазоотрицательные колонии в полужидкую среду с глюкозой (если это необходимо по дальнейшему ходу анализа).

Наличие активной оксидазы (изменение цвета колоний на сине-фиолетовый) у всех колоний, за исключением нехарактерных для БГКП, позволяет дать отрицательный ответ и закончить анализ через 18—24 ч.

Если выросли колонии, не обладающие оксидазной активностью, то из нескольких колоний каждого типа готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Отсутствие в мазках грамотрицательных, не образующих спор палочек позволяет дать отрицательный ответ и закончить анализ через 18—24 ч.

Если красные и темно-красные колонии с металлическим блеском и без него (лактозоположительные) образованы грамотрицательными палочками, не обладающими оксидазной активностью, то их число подсчитывают и при содержании свыше трех в 1 $дм^3$ питьевой воды централизованного водоснабжения и свыше 10 в 1 $дм^3$ воды децентрализованного водоснабжения немедленно (через 16—18 ч) дают ответ о наличии фекального загрязнения, превышающего норму.

В сомнительных случаях, когда нет уверенности, что колонии образованы бактериями, ферментирующими лактозу, а также при наличии на фильтрах розовых, розовых с центром, бесцветных колоний грамотрицательных и оксидазоотрицательных палочек их подсчитывают (каждый тип колоний отдельно) и принадлежность к БГКП подтверждают посевом двух-трех изолированных колоний каждого типа в полужидкую среду с глюкозой. Учет проводят через 4—5 ч инкубации посевов при 37 °С.

При образовании кислоты и газа результат считают положительным, при отсутствии кислоты и газа — отрицательным. Анализ заканчивают через 24—28 ч. При наличии только кислоты пробирки оставляют в термостате для окончательного учета газа через 24 ч.

Подсчитывают сумму лактозоположительных колоний и тех из лактозоотрицательных, которые ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа при 37 °С в течение 24 ч.

Результат анализа вычисляют по ГОСТ 18963 и выражают числом БГКП в 1 $дм^3$ воды (колииндекс).

4.1.3. Определение бактерий — показателей свежего фекального загрязнения (преимущественно E. co1i)

К бактериям — показателям свежего фекального загрязнения относят кишечные палочки, обладающие способностью ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре (44±0,5) °С и образовывать индол при этой температуре.

При наличии на мембранных фильтрах темно-красных колоний с металлическим блеском и без него такие колонии (но не более 15) засевают в среду с полужидкой лактозой с добавлением триптофана, предварительно нагретую до температуры 43—44 °С. В засеянные пробирки под пробку вставляют реактивные полоски для обнаружения продукции индола, немедленно помещают в термостат и инкубируют при температуре (44,0±0,5) °С 18—20 ч. Образование кислоты и газа

в пробирках и ярко-малиновый цвет реактивной полоски указывают на наличие бактерий — показателей свежего фекального загрязнения.

4.2. Проведение полного анализа с помощью переносной лаборатории с последующей доставкой посевов в стационарную лабораторию

С помощью переносной лаборатории, укомплектованной в соответствии с п. 2.2, выполняют посев проб воды для определения числа сапрофитных микроорганизмов и БГКП по пп. 4.1.1; 4.1.2.

Посевы должны быть доставлены в лабораторию не позднее чем через 3—4 ч с момента посева без термостата и через 24 ч при наличии термостата.

Идентификацию БГКП и учет результатов проводят в стационарной лаборатории в соответствии с пп. 4.1.1.3 и 4.1.2.3.

4.3. Проведение анализа с помощью переносной лаборатории на месте отбора проб сокращенными методами

4.3.1. Определение числа сапрофитных бактерий

При наличии в комплекте лаборатории аппаратуры и материалов, перечисленных в п. 2.3, проводят анализ в соответствии с п. 4.1.1.

Допускается использовать метод мембранных фильтров (4—5 фильтров на одну чашку) или капельную методику (до восьми посевов на одну чашку).

4.3.1.1. Метод мембранных фильтров

Фильтруют с помощью прибора подлежащие анализу пробы воды или ее разбавления.

При отсутствии фильтровального прибора можно выполнить фильтрование, используя фильтр-шприц или несколько слоев фильтровальной бумаги.

Мембранные фильтры, смоченные предварительно в стерильной воде, накладывают на 10—15 слоев фильтровальной бумаги (верхний лист должен быть стерильным) и пипеткой накапывают отдельными порциями требуемый объем воды, не допуская растекания ее за пределы мембранного фильтра.

Фильтры накладывают на поверхность питательного агара, разлитого заранее в чашки Петри (или другую посуду), инкубируют посевы 24 ч при 37 °С и подсчитывают общее число выросших колоний.

Существенно упрощает подсчет и дает представление о качественном составе сапрофитной микрофлоры использование оксидазного реактива или бумажной индикаторной системы на оксидазу. Выполняют оксидазный тест так же, как это делают при определении БГКП методом мембранных фильтров. После проявления реакции колонии четко видны.

4.3.1.2. Капельный метод

На поверхность хорошо подсушенного питательного агара с помощью микропипетки по каплям вносят 0,01 или 0,02 $см^3$ испытуемой воды или ее разведений. Чашки переворачивают только после полного высыхания капли. После инкубации посевов при 37 °С 24 ч подсчитывают количество колоний с помощью лупы. Подсчет облегчается проявлением оксидазной реакции после введения по каплям (на место посева) реактива для определения оксидазного теста.

Капельный метод применяют для исследования загрязненных вод из-за малого объема, который можно наносить в виде одной капли.

4.3.2. Определение бактерий группы кишечных палочек

Фильтрование воды через мембранные фильтры допускается проводить любым из способов с использованием оборудования, входящего в комплект лаборатории. Необходимым условием при этом является: после фильтрования

нужного объема воды с нижней стороны фильтра должна быть удалена лишняя влага; бактерии должны быть равномерно распределены по фильтрующей поверхности фильтра, не попадать на его края и обратную сторону.

Посевы выращивают на одной из сред для БГКП: Эндо двууглеводной, питательных подкладках и др.

Посевы инкубируют в термостате любой системы. Допускается колебание температуры (37±2) °С.

4.3.2.1. Обработка результатов при работе на двууглеводной среде

На двууглеводной среде все БГКП, включая лактозоотрицательные, растут в виде темно-красных колоний с металлическим блеском или без него.

При отсутствии какого-либо роста на фильтрах или при наличии только пленчатых, губчатых с неровной поверхностью и краями, плесневых и других нехарактерных для кишечных палочек колоний, а также бледно-розовых плоских небольших колоний дают отрицательный ответ.

При росте на фильтрах характерных для кишечных палочек колоний выполняют оксидазный тест, как это описано в п. 4.1.2.3, и подсчитывают колонии, не изменившие первоначального цвета: темно-красные с металлическим блеском и без него, а также слизистые крупные выпуклые розовые; с красным центром, с отпечатком на обратной стороне фильтра.

В сомнительных случаях или при возникновении разногласий в оценке качества воды определяют способность бактерий ферментировать глюкозу с образованием кислоты и газа, используя полужидкую среду с глюкозой или углеводно-бумажные диски.

При использовании углеводно-бумажных дисков питательный агар, который остался после заливки посевов для определения числа сапрофитных бактерий, разливают толстым слоем в чашки Петри. Диск берут пинцетом, краем забирают подлежащую изучению колонию, а затем опускают в толщу агара под углом к поверхности. При этом не следует допускать образования пузырьков воздуха и опускания диска до дна чашки.

Посевы инкубируют 3—4 ч при 37 °С. На положительный результат указывают изменение цвета индикатора и газообразование.

4.3.2.2. Обработка результатов при использовании питательных подкладок со средой ТРС

Готовую питательную подкладку смачивают в стерильной чашке Петри, куда налита стерильная дистиллированная вода. После полного пропитывания подкладки снизу на верхнюю ее сторону накладывают мембранный фильтр, на который профильтрован определенный объем испытуемой воды. Подкладку с фильтром помещают в любую стерильную достаточно герметичную камеру типа чашки Петри. Инкубируют посевы при температуре 37 °С 18—24 ч. Подсчитывают все выросшие темно-малиновые блестящие колонии. Очень мелкие слабоокрашенные колонии не учитывают.

4.4. Выполнение анализа воды сигнальными методами

Сигнальные методы не позволяют получать точные данные о количестве БГКП в воде. Поэтому сигнальные методы могут быть использованы как ориентировочные. При получении результатов, превышающих допустимые нормы, анализ воды выполняют одним из методов, приведенных в пп. 4.1—4.3. Должно быть указано, каким методом проводят анализ (полным, сокращенным или сигнальным).

4.4.1. Определение числа бактерий группы кишечных палочек с помощью индикаторных питательных полосок

Для анализа используют индикаторные бумажки для определения кишечных палочек в молоке, молочных продуктах и смывах с оборудования.

Разрезают полиэтиленовый пакетик. Большим и средним пальцами левой руки слегка сжимают пакетик с боков, примерно в середине, так, чтобы он немного расширился. Полоску вынимают из пакетика пинцетом.

Питательную полоску пинцетом погружают в вертикальном положении в испытуемую воду и держат в воде до полного пропитывания (несколько секунд). Капли воды, оставшиеся на полоске, удаляют осторожным встряхиванием.

Влажную полоску помещают в сжатый в виде трубочки пакетик, не касаясь его стенок.

Пакетик сжимают большим и указательным пальцами левой руки, добиваясь плотного прилипания полоски к его стенкам. Край полоски, за который держали пинцетом, отрывают.

Пакетик из полиэтиленовой пленки герметично запаивают над огнем. Для этого его помещают между двумя предметными стеклами так, чтобы из-под них выступала запаиваемая кромка шириной не более 1 мм, которую быстро проводят над огнем.

Запаянный пакетик помещают в термостат при температуре (42±2) °С, возможна температура инкубации (37±2) °С.

Через 10—12 ч подсчитывают ясно видимые малиновые колонии на обеих сторонах бумажной полоски. При более длительном инкубировании колонии сливаются и подсчет их затрудняется.

Вычисление колииндекса.

Вычисляют колииндекс с учетом объема воды, впитывающегося в полоску. Если индикаторная полоска впитывает 0,5 $см^3$ испытуемой воды, то значение колииндекса получают умножением количества подсчитанных колоний на 2000.

Положительный результат свидетельствует о массивном фекальном загрязнении.

4.4.2. Титрационный метод определения бактерий группы кишечных палочек с использованием среды КОДА

Среда имеет в своем составе ингибитор, не требует строгой асептики и не теряет свойств под воздействием света. Ориентировочный ответ может быть дан по изменению цвета индикатора.

Для посева 1 $см^3$ воды и ее разведений используют среду нормальной концентрации. Для посева 10, 50 и 100 $см^3$ воды используют соответствующие объемы среды двойной концентрации, увеличивая количество сухого препарата на тот же объем воды в 2 раза.

При исследовании питьевой воды централизованного водоснабжения засевают 3 объема по 100 $см^3$, 3 объема по 10 $см^3$ и 3 объема по 1 $см^3$. При исследовании питьевой воды децентрализованного водоснабжения засевают 1 объем по 50 $см^3$, 5 объемов по 10 $см^3$ и 5 объемов по 1 $см^3$.

При исследовании источников, где предполагается загрязнение, диапазон засеваемых десятикратных объемов воды необходимо расширить, например 3 по 100 $см^3$, 3 по 10 $см^3$, 3 по 1 $см^3$, 3 по 0,1 $см^3$, чтобы в наименьших объемах получить один или несколько отрицательных результатов.

Допускается использовать при исследовании воды источников децентрализованного водоснабжения схему однорядного посева: 100, 10, 1, 0,1, 0,01 $см^3$.

100 и 10 $см^3$ воды вносят во флаконы и пробирки с 100 и 10 $см^3$ концентри-

рованной среды КОДА. 1 $см^3$ воды и 1 $см^3$ из разбавлений вносят в пробирки с 10 $см^3$ среды нормальной концентрации. Посевы инкубируют при 37 °С.

Результаты учитывают предварительно через 24 ч, окончательно — через 48 ч. Положительным считается появление мути и изменение цвета индикатора. Колииндекс высчитывают по таблицам в приложении ГОСТ 18963 или по таблице в приложении 1 к настоящему стандарту.

Погрешность метода не должна превышать 30 %.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Справочное

ТАБЛИЦА РАСЧЕТА ЧИСЛА БАКТЕРИЙ В 1 $дм^3$ ВОДЫ (ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА)

Число положительных реакций из			Число бактерий в 1 $дм^3$ (индекс)	Число положительных реакций из			Число бактерий в 1 $дм^3$ (индекс)
1 объема по 50 $см^3$	5 объемов по 10 $см^3$	5 объемов по 1 $см^3$		1 объема по 50 $см^3$	5 объемов по 10 $см^3$	5 объемов по 1 $см^3$	
0	0	0	Менее 10	1	2	1	70
0	0	1	10	1	2	2	100
0	0	2	20	1	2	3	120
0	1	0	10	1	3	0	80
0	1	1	20	1	3	1	110
0	1	2	30	1	3	2	140
0	2	0	20	1	3	3	180
0	2	1	30	1	3	4	210
0	2	2	40	1	4	0	130
0	3	0	30	1	4	1	170
0	3	1	50	1	4	2	220
0	4	0	50	1	4	3	280
1	0	0	10	1	4	4	350
1	0	1	30	1	4	5	430
1	0	2	40	1	5	0	240
1	0	3	60	1	5	1	350
1	1	0	30	1	5	2	540
1	1	1	50	1	5	3	920
1	1	2	70	1	5	4	1600
1	1	3	50	1	5	5	Более 2400
1	2	0	50				

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Справочное

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

передвижная лаборатория: Лаборатория, которую монтируют на специально для этого предназначенных транспортных средствах (железнодорожных вагонах, автомобилях, судах и т. п.).

переносная лаборатория: Набор оборудования для выполнения санитарно-микробиологического анализа, который возможно переносить человеку или группе лиц на значительное расстояние или перевозить на транспорте, специально для этих целей не предназначенном.

полевые методы: Методы, предназначенные для проведения санитарно-микробиологического анализа вне стационарной лаборатории.

сигнальные методы: Методы ориентировочные, применяемые в геологических партиях, на судах дальнего плавания и т. п.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 23.06.81 № 3061

2. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

3. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 1770—74	2.1	ГОСТ 25706—83	2.1, 2.3
ГОСТ 1820—2001	2.1	ГОСТ 27068—86	2.1
ГОСТ 5556—81	2.1	ГОСТ 29227—91	2.1, 2.2
ГОСТ 5962—67	2.1, 2.2	ОСТ 25—11—38—84	2.1
ГОСТ 6709—72	2.1, 2.4.2	ТУ 6—09—5303—86	2.1
ГОСТ 13739—78	2.1	ТУ 6—09—5417—88	2.1
ГОСТ 18963—73	Вводная часть, 2.1, 3.1, 3.2.1, 4.1.2.2, 4.1.2.3, 4.4.2		

4. Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 4—94)

5. ПЕРЕИЗДАНИЕ

gost.e-ecolog.ru