

Министерство здравоохранения Республики Беларусь



«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

В.И.Качан

11 20 09 г.

Регистрационный № 068-1109

МЕТОДЫ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПИТЬЕВЫХ ВОД

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы: Л.А.Мельникова, Н.В.Дудчик, И.П.Щербинская, О.Е.
Шедикова, Т.С.Трешкова

Минск-2009

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) определяет методы санитарно-бактериологического контроля питьевых вод, предназначенных для употребления человеком, в том числе расфасованных в бутылки, бутылки, контейнеры, пакеты и другие емкости (далее – расфасованная вода), предназначенных для реализации потребителю в отношении ее эпидемической безопасности по бактериологическим показателям.

2. Настоящая инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций, контролирующих качество питьевой воды.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

3. Оборудование.

Нормативная документация
(СТБ, ГОСТ, ТУ и другие)

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (pH-метр) ГОСТ 19881-74

Анаэроостат, анаэробные камеры, эксикатор, емкость с герметично закрывающейся крышкой.

Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках ТУ 64-1-2451-78

Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(44 \pm 0,5) ^\circ C$ ГОСТ 12026-76

Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(75 \pm 5) ^\circ C$

Весы лабораторные квадрантные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г ГОСТ 24104-2001

Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000 г

Дистиллятор электрический

Дозаторы пипеточные

ГОСТ 28311-89

Лупа с двукратным увеличением	ГОСТ 25706-83
Микроскоп световой биологический с увеличением 90-1000 ^x	ГОСТ 8284-78
Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разрежения 0,5-1,0 атм.	
Стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см ²)	«Правила устройства и безопасной безопасности сосудов, работающих под давлением», утвержденные приказом-постановлением МЧС РБ и Министерства труда РБ от 30.04.1998г. № 33/45
Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (180±5) °С	
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С	ГОСТ 24498-90
Термостат электрический суховоздушный для температурного режима (44±0,5) °С	
Термостат электрический суховоздушный для температурного режима (37±1) °С	
Хладотермостат электрический для температурного режима (22±1) °С	
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83

4. Материалы.

	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и другие)
Анаэробный агент: анаэробная система FN25-supplier-OXOID	
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-091181-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82Е
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Колпачки металлические для пробирок	
Маркеры водостойкие	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93

Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации;	
Наконечники к дозаторам	ГОСТ 21241-89
Ножницы	
Палочки стеклянные	
Петли бактериологические	
Пинцеты для работы с мембранными фильтрами	
Пипетки разной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 20292-74
Поплавки (трубки Дархема)	
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие высокую температуру, стерилизацию	ГОСТ 12026-76
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90Е
Стекла предметные	ГОСТ 9284-75
Стекла покровные	ГОСТ 6672-75
Цилиндры мерные на 100-500 см ³	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 см ³	
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932-90Е

5. Реактивы и питательные среды.

	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и другие)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
Агар питательный сухой	ФС 42-188ВС-90
Азид натрия	
Азидная среда Сланеца	
Амиловый (бутиловый) спирт	
L-аргинин	
Бромтимоловый синий	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

Глюкоза	ГОСТ 6038-79
Дрожжевой экстракт	
Железосульфитный агар	
Железо серноокисное закисное 7-водное	ГОСТ 4148-78
Железо хлористое	
Казеин трипсиновой ферментации	
Калий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 4198-75
Калия гидроксид	
Кислота соляная	ГОСТ 3118-77
Кристаллический фиолетовый водорастворимый	
Лактоза	ГОСТ 6038-74
Лактозо-пептонная среда	
Молоко обезжиренное	
Магния сульфат	
Мясо-пептонный агар	
Набор реактивов для окраски по Граму	ГОСТ 10444.1-84
Натрий-аммоний фосфорнокислый	
Натрия сульфит	ГОСТ 195-77
Натрия хлорид	ГОСТ 4233-77
α -нафтол	ГОСТ 923-80
Пара-диметиламинобензальдегид	
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805-76
Перекись водорода 3 %	ГОСТ 10929-76
Питательная среда для выделения энтерококков, сухая	
Реактив Ковача	
Системы индикаторные бумажные (далее – СИБ)СИБ-лактоза	
СИБ-оксидаза	
Спирт этиловый ректификованный	СТБ 1334-2003
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300-87
Среда Блеск	
Среда Бонде	
Триптофановый бульон	
L-триптофан	
2,-3,-5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ)	
Фенилендиаминовые соединения (тетраметил-пара-фенилендиамин гидро- хлорид или диметил-пара-фениледиамин	

солянокислый)
Фуксин основной
Фуксин-сульфитная среда Эндо
Цитрат натрия трехзамещенный

ФС 42-186ВС-90

6. Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по ТНПА, утвержденным в установленном порядке.

ГЛАВА 3 ПОДГОТОВКА К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

7. Подготовка посуды и материалов.

Вся посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной. Подготовка посуды и материалов следует проводить в соответствии с Методическими указаниями «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» № 11-10-1-2002, утвержденными Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 25.02.2002 г.

8. Приготовление растворов, реактивов и питательных сред.

8.1. Общие требования.

При выполнении микробиологического анализа предпочтительно использовать стандартизированные сухие питательные среды промышленного производства, их приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя. Питательные среды, разлитые в чашки и хранящиеся в холодильнике, перед посевом должны быть прогреты до комнатной температуры. При наличии следов влаги на поверхности агаризованных питательных сред их подсушивают в термостате или ламинарном боксе, приоткрывая крышку, до исчезновения конденсата.

8.2. Приготовление растворов для разведений.

Солевой (физиологический) раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлорида натрия, устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации рН был $(7,0 \pm 0,1)$. Разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре $(120 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 20 минут. Разливают мерно в

пробирки непосредственно перед посевом. Срок хранения – до 1 месяца при комнатной температуре.

Пептонный раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации рН был $(7,0 \pm 0,1)$. Разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С 20 минут. Разливают мерно в пробирки непосредственно перед посевом. Срок хранения – до 1 месяца при комнатной температуре.

Пептонный солевой раствор. В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 8,5 г хлорида натрия и 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации рН был $(7,0 \pm 0,1)$. Разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С 20 минут. Разливают мерно в пробирки непосредственно перед посевом. Срок хранения – до 1 месяца при комнатной температуре.

8.3. Питательные среды для определения общего микробного числа (ОМЧ).

Мясо-пептонный агар. Готовят по ГОСТ 10444.1 или используют сухие среды, которые готовят по прописи, указанной на этикетке.

Питательный агар. Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке. Питательный агар не допускается выдерживать в расплавленном состоянии более 8 часов. Оставшийся неиспользованный агар повторному расплавлению не подлежит.

8.4. Растворы, реактивы и питательные среды для выявления и определения количества общих и термотолерантных колиформных бактерий и *Escherichia coli*.

Фуксин-сульфитная среда Эндо.

Основная модификация. Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить. Срок хранения чашек со средой не более 2-3 суток в темноте, если производителем не оговорены другие сроки.

Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до $(60-70)$ °С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды 0,2 мл 5 %-ного спиртового раствора основного фуксина. Срок хранения раствора фуксина – не более 1 месяца.

8.5. Растворы для проведения оксидазного теста.

Спиртовой раствор α -нафтола концентрации 50 г/мл: 5,0 г α -нафтола помещают в колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этиловом спирте объемной концентрации 96% и доводят раствор этиловым спиртом до метки. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Готовят 1% водный раствор любого фенилендиаминового соединения (диметил-п-фенилендиамина солянокислого, дифенил-п-фенилендиамина).

Растворы хранят в темных флаконах с притертыми пробками: 1-й – до одного месяца, 2-й – до одной недели. Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора. Реактив может быть заменен коммерческими тест-системами для постановки оксидазного теста (СИБ-оксидаза или аналоги).

8.6. Растворы и реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

8.7. Раствор для проведения теста Греггерсона.

3 % водный раствор КОН.

8.8. Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу до кислоты и газа.

Полужидкая среда с лактозой. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4-5 г агара, доводят до кипения, устанавливают рН (7,2-7,4), добавляют 1 мл 1,6 % спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при (120 ± 2) °С 20 минут. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки на высоту 3-5 см и стерилизуют при (112 ± 2) °С 12 минут. Срок хранения – не более 2 недель при комнатной температуре. Правильно приготовленная среда зеленого цвета с синеватым оттенком (цвет бутылочного стекла). При образовании кислоты цвет среды изменяется на желтый.

Лактозо-пептонная среда. 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы, 1 мл 1,6 % раствора бромтимолового синего растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают рН (7,4-7,6), разливают по 3-5 мл в пробирки с поплавком, стерилизуют при (112 ± 2) °С 12 минут.

8.9. Реактивы и среды для контроля продукции индола из триптофана.

Триптофановый бульон. 10 г казеин трипсиновой ферментации, 1 г L-триптофана, 5 г натрия хлористого растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды и разливают по 3 мл в пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, пластиковыми или металлическими крышками (колпачками), затем стерилизуют в течение 15 минут при температуре (120 ± 2) °С. Полученную среду хранят в защищенном от света месте при температуре (5 ± 3) °С не более 10 суток.

Реактив Ковача. Приготовление реактива проводят в вытяжном шкафу. При этом необходимо использовать защитные перчатки и очки и избегать контакта с реагентами. Амиловый спирт может вызвать раздражение слизистых оболочек и головокружение. В 75 мл амилового

или бутилового спирта (не содержащего органических оснований) растворяют 5 г п-диметиламинобензальдегида. Осторожно добавляют 25 мл концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 г/мл. Цвет реактива должен быть от светло-желтого до светло-коричневого. Реактив хранят при температуре (5 ± 3) °С в защищенном от света месте.

8.10. Приготовление питательных сред для выявления *Pseudomonas aeruginosa*.

Концентрат среды Бонде. Трехзамещенного цитрата натрия 28 г, натрий-аммония фосфорнокислого 15 г, калия фосфорнокислого однозамещенного 10 г, сульфата магния 2 г, дистиллированной воды до 1 л. Растворить все компоненты в дистиллированной воде при нагревании. Стерилизовать в течение 20 минут при температуре (120 ± 2) °С. Непосредственно перед посевом прибавить 5 мл 0,01 % водного раствора кристаллического фиолетового на 100 мл среды.

Среда Блеск. 100 мл питательного агара стерильного, приготовленного из сухого препарата по прописи на этикетке, расплавляют на водяной бане. После охлаждения до температуры приблизительно 50 °С добавляют 0,3 г L-аргинина, 8 мл 10% водного раствора трифенилтетразолий хлорида (ТТХ), 10 мл стерильного обезжиренного теплого молока, тщательно перемешивают и разливают в чашки по 25 мл.

8.11. Приготовление питательных сред для выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий.

Железосульфитный агар.

Приготовление основной среды: в 1 л стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10 г глюкозы, нагревают до растворения, разливают мерно во флаконы, стерилизуют при температуре (112 ± 2) °С 12 минут.

20 % раствор сульфита натрия и 8 % раствор железа сернокислого закисного или железа хлористого готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20 % раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8 % раствора серно-кислого железа, перемешивают и стерильно разливают в пробирки высоким столбиком либо в чашки Петри, в зависимости от способа посева.

8.12. Приготовление питательных сред для выявления и определения количества энтерококков.

Азидная среда Сланца в модификации Т.З. Артемьевой. 30-40 г сухого питательного агара, 4 г калия фосфорнокислого однозамещенного расплавляют при нагревании в 1 л дистиллированной воды,

устанавливают рН ($7,0 \pm 0,1$), разливают мерно во флаконы, стерилизуют при (120 ± 2) °С 20 минут. Перед употреблением в расплавленный и слегка остуженный агар добавляют из расчета на 100 мл среды: дрожжевого экстракта – 2 мл, глюкозы – 1 г, азида натрия – 0,04 г, 1%-ного водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) – 1 мл. Тщательно смешивают, разливают в чашки Петри по 25 мл. Хранят в холодильнике не более 2 недель. Среду можно готовить непосредственно перед употреблением без стерилизации в автоклаве.

Питательная среда для выделения энтерококков. Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.

ГЛАВА 4 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

9. Отбор и подготовка проб – по ГОСТ 26668, ГОСТ 266669 или по техническим нормативно-правовым актам на анализируемый продукт.

10. При анализе питьевых газированных вод отбирают необходимый для исследования объем (в соответствии с требованиями ТНПА, в зависимости от определяемых показателей) в стерильную колбу с ватно-марлевой стерильной пробкой, встряхивают несколько раз и оставляют на 5-10 минут для дегазации.

11. Перед посевом пробу тщательно, без образования пены, перемешивают не менее 30 секунд и фламбируют край емкости. Используемые пробирки и чашки маркируют. Перед каждым отбором новой порции воды пробу тщательно перемешивают.

12. Приготовление разведений.

Для посева объемов воды, меньших, чем 1 мл, используют разведения анализируемой воды. Перед посевом раствор для разведений разливают по 9 мл в пробирки с соблюдением правил стерильности. Затем в первую пробирку с 9 мл раствора вносят 1 мл анализируемой воды. При этом наконечник не должен быть опущен ниже поверхности воды, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. Другой стерильной пипеткой или дозатором тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают из нее 1 мл и переносят в чашку Петри, что будет соответствовать посеву 0,1 мл анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов, этой же пипеткой переносят 1 мл содержимого первой пробирки в следующую пробирку раствора для разведения. Другой стерильной пипеткой делают посев 1 мл из второй пробирки, что будет соответствовать посеву 0,01 мл анализируемой воды. Время от момента приготовления разведений и заливки питательным агаром не должно превышать 30 минут.

ГЛАВА 5 ПРОВЕДЕНИЕ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

13. Методика работы при использовании мембранных фильтров.

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

Воронку и столик фильтровального аппарата обтирают марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом ректификованным, и фламбируют. После охлаждения на столик фильтровального аппарата кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его воронкой.

В воронку прибора для фильтрования наливают отмеренный объем воды, затем создают вакуум.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат без обеззараживания сначала меньшие, а затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают. Следует начинать с фильтрования воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы.

При фильтровании небольшого объема исследуемой воды следует в воронку налить предварительно не менее 10 мл стерильной воды, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования и осушения фильтра отключают вакуум, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, или в пробирки, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

14. Определение общего микробного числа (далее – ОМЧ) при температуре 37 °С и при температуре 22 °С.

14.1. Определение понятия показателя.

Метод определяет в расфасованной питьевой воде общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на плотном питательном агаре при температуре (37±1) °С и (22±1) °С, в течение 24 и 72 часов, соответственно, видимые с увеличением в 2 раза. При отсутствии видимых колоний, допускается дополнительное инкубирование посевов в течение 24 часов при аналогичных температурных условиях.

14.2. Проведение анализа.

Из каждой пробы воды делается посев исходного образца или его разведений с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Вносят по 1 мл образца или разведения в чашки Петри и заливают расплавленным и остуженным до 45 °С мясопептонным агаром в количестве 15-20 мл. Время между внесением пробы и агара не должно превышать 10-15 минут. Образец быстро смешивают с агаром, наклоняя или вращая чашку по поверхности стола. После застывания агара чашки помещают в термостат и инкубируют при температуре (37±1) °С и (22±1) °С в течение (24±2) и (72±2) часов, соответственно. Оценивают те разведения, при посеве которых на чашке выросло от 30 до 300 колоний. При посеве 1 мл неразведенной пробы учитывают любое количество колоний, не превышающее 300. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исходного образца, с учетом результатов разведений.

Если в чашке с наиболее высоким разведением выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, то допустимо вести подсчет с помощью счетной пластинки, разделенной на квадраты, или трафарета, делящего чашку на сектора. Подсчитывают не менее ¼ площади чашки в разных местах с последующим пересчетом на всю площадь чашки. Если рост подвижных бактерий распространяется на всю поверхность чашки, в протоколе отмечают «ползучий рост».

15. Метод выявления и определения количества общих колиформных бактерий (ОКБ), термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) и *Escherichia coli*.

15.1. Определение понятия показателей.

Общие колиформные бактерии – граммотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37±1) °С в течение 24-48 часов.

Термотолерантные колиформные бактерии – входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре (44±0,5) °С в течение (24±2) часов.

Escherichia coli – термотолерантные колиформные бактерии, продуцирующие индол из триптофана при температуре (44±0,5) °С в течение (22±2) часов.

15.2. Проведение анализа методом мембранной фильтрации.

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры с последующим культивированием на селективной среде, с идентификацией и учетом выросших бактерий.

Фильтруют объем воды, необходимый для получения изолированных колоний на фильтре. При получении стабильных

отрицательных результатов допускается фильтрация 300 мл воды через один фильтр. После окончания фильтрования фильтр переносят на поверхность чашки Петри со средой Эндо, сохраняя его положение при фильтрации. Чашки с фильтрами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) часов. Если на фильтрах нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, расплывчатые – выдается отрицательный ответ; анализ заканчивается через 24 часа.

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитывают число колоний каждого типа отдельно и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ.

15.3. Идентификация выросших бактерий.

Для подтверждения наличия ОКБ исследуются все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний и не менее 3-4 колоний каждого типа. Для подтверждения наличия ТКБ исследуют все типичные колонии, но не более 10.

Каждую выбранную изолированную колонию исследуют на наличие оксидазной активности и отношение к окраске по Граму (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Грегерсена). Все оксидазоотрицательные и грамотрицательные колонии пересевают на скошенный питательный агар для проведения дальнейшей идентификации.

Постановка оксидазного теста. Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2-3 каплями реактива для оксидазного теста. Готовые бумажные системы смачивают дистиллированной водой. Часть изолированной колонии стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 минуты появляется синее окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. При положительном результате эту колонию при дальнейшем исследовании исключают.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо повторить тест после инкубации колоний, пересеянных на скошенный питательный агар.

Из оксидазоотрицательной колонии делают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют:

- на обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют ее по поверхности стекла;
- мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки;
- на препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор кристаллического фиолетового, через 0,5-1,0 минуту бумагу снимают;
- наливают раствор Люголя на 0,5 -1,0 минуту, затем сливают его и промывают стекло обесцвечивающей жидкостью (96 % этиловым спиртом) пока не перестанет отходить краситель (15-30 секунд);
- стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1-2 минут раствором фуксина или сафранина;
- стекло промывают и просушивают фильтровальной бумагой;
- препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Тест Грегерсена. Окраска по Граму может быть заменена тестом Грегерсена, на требующим использования оптики. В капле 3 % водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются – реакция отрицательная.

15.4. Подтверждение способности ферментировать лактозу до кислоты и газа.

Для определения ферментации лактозы оставшаяся часть грамотрицательной, оксидазоотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой:

- для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 часов, в случае получения отрицательного результата через 24 часа, пробирку с посевом оставляют для окончательного учета до 48 часов;
- для подтверждения наличия ТКБ и *E. coli* посев осуществляют в предварительно прогретую до (43 ± 1) °С среду и инкубируют при $(44\pm 0,5)$ °С в течение (24 ± 2) часов.

Первичный учет кислоты и газа на подтверждающих средах возможен через 4-6 часов. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами оставляют до 24-48 часов.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, тогда для накопления материала ее пересевают на скошенный питательный агар.

При отсутствии через 24 часа газообразования в пробирках, инкубирующихся при температуре $(44\pm 0,5)$ °С, получают окончательный отрицательный ответ, при наличии газообразования – проводится дальнейшая идентификация ТКБ.

15.5. Подтверждение способности продуцировать индол из триптофана.

Колонии со скошенного питательного агара пересевают петлей в пробирки с триптофановым бульоном и инкубируют при температуре $(44\pm 0,5)$ °С в течение (22 ± 2) часов. После инкубирования определяют образование индола путем добавления 0,2-0,3 мл реактива Ковача.

Образование вишнево-красной окраски на поверхности триптофанового бульона считают положительной индольной реакцией, подтверждающей образование индола.

15.6. Учет результатов.

Грамотрицательные колонии учитывают как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при (37 ± 1) °С с образованием кислоты и газа.

Грамотрицательные колонии учитывают как ТКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при $(44\pm 0,5)$ °С с образованием кислоты и газа.

ТКБ, продуцирующие индол из триптофана при $(44\pm 0,5)$ °С, учитывают как *Escherichia coli*.

При отсутствии общих и термотолерантных колиформных бактерий на всех фильтрах выдают результат: «не обнаружено КОЕ ОКБ и *E. coli* в 300 мл» и «не обнаружено КОЕ ТКБ и *E. coli* в 300 мл».

В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний как ОКБ, ТКБ и *E. coli*, число колониеобразующих единиц подсчитывают на всех фильтрах и результат анализа выражают в КОЕ ОКБ, ТКБ и *E. coli* в 300 мл воды.

Вычисление проводят по формуле:

$$X = \frac{a * 300}{V}, \quad (1)$$

где: X – число колоний в 300 мл;

V – профильтрованный объем воды через фильтры, на которых велся учет;

a – число подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

Если при выборочной проверке колоний одного типа получаются неодинаковые результаты, то значения ОКБ, ТКБ или *E. coli* среди колоний этого типа вычисляются по формуле:

$$X = \frac{(a * c)}{b}, \quad (2)$$

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

Полученные результаты учета по каждому типу колоний суммируют и далее подсчитывают по формуле (1).

Выдают окончательный результат: количество КОЕ ОКБ в 300 мл, из них количество КОЕ ТКБ в 300 мл, из них количество *E. coli* в 300 мл.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ, ТКБ и *E. coli* выдают качественный результат. При необходимости количественного учета анализ повторяют с использованием большего числа фильтров. Если все колонии на фильтре (фильтрах) оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают «зарост фильтров».

16. Выявление бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

16.1. Определение понятия показателя.

Pseudomonas aeruginosa – грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию, образуют проникающий в субстрат пигмент феназинового ряда, имеющий буроватый оттенок с вариантами от сине-зеленого (пиоцианин) до коричнево-красного, и способны к росту при температуре (42±1) °С.

16.2. Выполнение анализа.

Исследуют пробу воды объемом 1000 мл, разделенную в две емкости по 500 мл. В каждую емкость добавляют по 50 мл концентрата среды Бонде, тщательно перемешивают и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 24-48 часов. Возможно проводить фильтрацию исследуемых объемов воды и осуществлять посев фильтров в 50 мл концентрата среды Бонде.

Через 24 часа просматривают посеvy. При наличии роста *Pseudomonas aeruginosa* происходит помутнение среды Бонде и на поверхности появляется тонкая прозрачная пленка, часто поднимающаяся по стенке емкости. В журнале отмечают помутнение среды и наличие пленки.

Для подтверждения *Pseudomonas aeruginosa* делают посев на среду Блеск. Емкость перед посевом не следует взбалтывать. Петлей забирают пленку и делают посев штрихом для получения изолированных колоний по 3-4 из каждой емкости. Посев в виде бляшки: делают укол петлей до дна чашки и затем растирают небольшую площадку вокруг укола по поверхности среды. Допустимо делать посев нескольких проб на секторах одной чашки. Посевы со средой Блеск инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) часов.

Емкости со средой Бонде оставляют в термостате еще на 24 часа для окончательного учета.

Через 24 часа отмечают характер роста на среде Блеск. При наличии в пробе *Pseudomonas aeruginosa* на среде Блеск вырастают темно-красные колонии с золотистым блеском или золотистыми вкраплениями на бляшках. Появление блеска можно наблюдать уже через 20-22 часа инкубации при (37 ± 1) °С, но максимального развития реакция достигает через 42-44 часа.

Если на среде Блеск не отмечено роста или выросли колонии темно-красные, темно-вишневые, но без характерного блеска, то из емкостей, где отмечено помутнение или помутнение с пленкой, высев следует проводить через 48 часов.

При отсутствии роста в среде Бонде через 24 часа пробу инкубируют до 48 часов и в случае помутнения и образования пленки подтверждают *Pseudomonas aeruginosa*, как описано выше.

Подтвердить наличие *Pseudomonas aeruginosa* также можно путем посева подозрительной изолированной колонии на косяк с питательным агаром, на котором через 24 часа инкубации при температуре (37 ± 1) °С в случае положительной реакции появляется синий, сине-зеленый пигмент. Пигментация может усиливаться при последующем выдерживании косяка на свету при комнатной температуре.

16.3. Учет результатов.

Отрицательный ответ выдают:

- при отсутствии признаков роста в посевах пробы в среде Бонде;
- при отсутствии признаков роста на среде Блеск;
- при росте на среде Блеск не характерных для *Pseudomonas aeruginosa* колоний без блеска.

Результат формулируют: *Pseudomonas aeruginosa* не обнаружена в 1000 мл воды.

Положительный ответ выдают:

- при росте на среде Блеск темно-окрашенных колоний с золотистым блеском;
- при образовании характерного пигмента на питательном агаре.

При четкой реакции на среде Бонде (муть и пленка) и среде Блеск наличие пигмента определять не обязательно.

Результат формулируют: *Pseudomonas aeruginosa* обнаружена в 1000 мл воды.

17. Выявление и определение количества спор сульфитредуцирующих клостридий.

17.1. Определение понятия показателя.

Сульфитредуцирующие клостридии – спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия до сульфидов на железосульфитном агаре при температуре $(44\pm 0,5)$ °С в течение 16-18 часов.

Метод основан на выращивании посевов в железосульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа типичных колоний.

17.2. Подготовка к исследованию.

Пробу воды объемом 50 мл прогревают на водяной бане в пробирках при температуре (75 ± 5) °С в течение 15 минут для инактивации вегетативных форм. Из каждой пробы питьевой воды делают посев или фильтруют 50 мл. При необходимости подбирают объемы с таким расчетом, чтобы в посевах (на фильтрах) выросло не более 10-15 колоний. При этом ориентируются на результаты предыдущих исследований.

17.3. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий методом фильтрования в пробирках.

Перед посевом железосульфитный агар в пробирках расплавляют на водяной бане (не кипятить). В течение посева пробирки со средами держат в водяной бане при температуре (75 ± 5) °С. После фильтрования установленного объема воды мембранный фильтр берут фламбированным пинцетом за два противоположных края и согнутым в виде трубочки помещают в пробирку с горячим агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями должна быть обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки.

Сразу после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий охлаждают, помещая в емкость с холодной водой. Культивируют посеvy при $(44\pm 0,5)$ °С в течение 16-18 часов.

17.4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий методом фильтрования в чашках Петри.

Чашки Петри диаметром 55-60 мм заливают тонким слоем железосульфитного агара. После фильтрации исследуемого объема воды фильтр помещают фильтрующей поверхностью вниз на застывшую питательную среду так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем заливают расплавленным железосульфитным агаром до верхнего края чашки, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания

анаэробных условий. Культивируют посеvy при $(44\pm 0,5)$ °C в течение 16-18 часов. Допускается помещать фильтры на поверхность железосульфитного агара и инкубировать посеvy в анаэроостате, анаэробной камере, эксикаторе, емкости с герметично закрывающейся крышкой, в который вкладывают анаэробный агент, при $(44\pm 0,5)$ °C в течение 16-18 часов.

17.5. Учет результатов.

Количественному учету подлежат только те посеvy, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтре, так и в толще питательной среды.

Результат анализа выражают числом КОЕ спор сульфитредуцирующих клостридий в 50 мл воды. При отсутствии роста черных колоний на всех фильтрах, дают ответ «не обнаружено в 50 мл воды».

При невозможности учета колоний из-за сливного роста, результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в 50 мл», при необходимости получения количественного результата анализ повторяют.

18. Выявление и определение количества энтерококков.

18.1. Определение понятия показателя.

Энтерококки – грамположительные, полиморфные, круглые, чаще слегка вытянутые с заостренными концами, клетки, располагающиеся попарно или в коротких цепочках. Являются показателями фекального загрязнения воды.

18.2. Определение энтерококков методом мембранной фильтрации.

Исследуемый объем воды фильтруют через 1 или несколько мембранных фильтров. Фильтры с посевами помещают на чашки Петри со средой, содержащей азид натрия, и инкубируют при температуре (37 ± 1) °C в течение (24 ± 2) часов.

Учет результатов проводится на фильтрах, содержащих от 5 до 50 колоний. Подсчитывают колонии, характерные для энтерококков: выпуклые, с ровными краями, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным не четко оформленным центром. Как правило, все колонии, которые растут на азидной среде, можно отнести к фекальным стрептококкам, имеющим индикаторное значение. Очень мелкие (на пределе видимости невооруженным глазом), плоские разных оттенков колонии не учитывают.

18.3. Идентификация выросших бактерий.

При необходимости подтверждения принадлежности выросших колоний к энтерококкам, определяют отсутствие каталазной активности и 2-3 колонии каждого типа микроскопируют после окраски по Граму.

Каталазный тест можно выполнить путем нанесения петлей капли 3 % перекиси водорода на подозрительные колонии. Более точно каталазный тест выполняют на предметном стекле, нанося петлей культуру и, после высушивания на воздухе, добавляя каплю свежеприготовленной 3 % перекиси водорода и прикрывая покровным стеклом. Наличие пузырьков газа – положительный тест.

18.4. Учет результатов.

Результат анализа выражают числом КОЕ энтерококков в исследуемом объеме воды. При отсутствии роста типичных колоний на всех фильтрах, дают ответ «не обнаружено в X мл воды», где X – исследуемый объем воды. При сливном росте колоний, результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в X мл воды», где X – исследуемый объем воды.

Мельникова Л.А.

Дудчик Н.В.

Щербинская И.П.

Шедикова О.Е.

Трешкова Т.С.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по применению
«Методы санитарно-бактериологического контроля питьевых вод»
стр.

Глава 1 Назначение и область применения.....	2
Глава 2 Оборудование, материалы и питательные среды.....	2
Глава 3 Подготовка к микробиологическому анализу.....	6
Глава 4 Отбор и подготовка проб	10
Глава 5 Проведение санитарно-гигиенических исследований.....	11

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая инструкция разработана специалистами государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Мельникова, Н.В. Дудчик, Щербинская, Л.А. О.Е. Шедикова, Т.С. Трешкова).
2. Утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 20____ г., регистрационный №
3. Введена впервые.