

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

В.И.Качан

2010 г.

Регистрационный № 092-0610



МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА
ГЛЮКОЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ В
ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ

Инструкция по применению

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

Авторы: Н.В.Дудчик, О.Е.Шедикова, Е.А.Будкина, С.А Янецкая,
Е.В.Дроздова

Минск-2010

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) определяет метод определения глюкозоположительных колиформных бактерий в питьевой воде, предназначенной для употребления человеком, в том числе расфасованной в бутылки, бутылки, контейнеры, пакеты и другие емкости (далее – расфасованная вода), предназначенной 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 $pH \pm 0,1$ (рН-метр)	ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках	ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(45 \pm 5) ^\circ C$	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-2001
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 (37±1) °С	
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83

4. Материалы

Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и другие)

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
Пробирки бактериологические типов П1 и	ГОСТ 25336-82

П2	
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	ФС 42-188ВС-90
Бромтимоловый синий	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Глюкоза	ГОСТ 6038-79
Калия гидроксид	
Мясо-пептонный агар	
Набор реактивов для окраски по Граму	ГОСТ 10444.1-84
α -нафтол	ГОСТ 923-80
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805-76
Системы индикаторные бумажные (далее – СИБ) СИБ-глюкоза	
СИБ-оксидаза	
Спирт этиловый ректифицированный	
Спирт этиловый ректифицированный технический	
Фуксин-сульфитная среда Эндо	ФС 42-186ВС-90
Фенилендиаминовые соединения (тетраметил-пара-фенилендиамин гидрохлорид или диметил-пара-фенилендиамин солянокислый)	

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. Фуксин-сульфитная среда Эндо.

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.

8.3. 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).

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

8.5. Раствор для проведения теста Греггерсона.

3 % водный раствор КОН.

8.6. Питательные среды для подтверждения способности ферментировать глюкозу до кислоты и газа.

Полужидкая среда с глюкозой. 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 глюкозы, 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.

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.

ГЛАВА 5

ВЫЯВЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЛЮКОЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ

12. Определение понятия показателей.

Глюкозоположительные колиформные бактерии – грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных глюкозных средах, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. Индикаторная группа ГКБ включает в себя общие и термотолерантные колиформные бактерии, кроме того, лактозоотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, растущие на среде Эндо в виде разного типа розовых колоний.

Определение этого показателя, являющегося гигиенически надежным и чувствительным, позволяет контролировать отсутствие в воде не только индикаторных, но и патогенных и условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

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. Проведение анализа.

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 (темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра) либо лактозоотрицательных (розовых, розовых с красным центром, бледно-розовых, белесых) колоний, подсчитывают число колоний на всех фильтрах и подтверждают их принадлежность к ГКБ.

15. Идентификация выросших бактерий.

Для подтверждения наличия ГКБ исследуются все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний и не менее 3-4 колоний каждого типа.

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.

15.1. 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 красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо повторить тест после инкубации колоний, пересеянных на скошенный питательный агар.

15.2. 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.

15.3. 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 глюкозу до кислоты и газа.

Для определения ферментации глюкозы оставшуюся часть грамотрицательной, оксидазоотрицательной изолированной колонии засевают пробирку с полужидкой глюкозной средой и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 4 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 ± 4 часов.

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

Для определения утилизации глюкозы можно использовать СИБ-глюкоза или другие тесты. При проведении анализа необходимо следовать рекомендациям изготовителя.

15.5. Учет результатов.

Лактозонегативные колонии учитывают как ГКБ при отрицательном оксидажном тесте и ферментации глюкозы при (37 ± 1) °С с образованием кислоты и газа.

При отсутствии глюкозоположительных колиформных бактерий на всех фильтрах выдают результат: «не обнаружено КОЕ ГКБ в 300 мл».

При росте на фильтрах изолированных типичных лактозоположительных или лактозоотрицательных колоний, колонии учитывают как ГКБ при отрицательном оксидажном тесте и ферментации глюкозы при (37 ± 1) °С с образованием кислоты и газа. В данном случае число колониеобразующих единиц подсчитывают на всех фильтрах и результата анализа выражают в КОЕ ГКБ в 300 мл.

Расчет числа колоний 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 ГКБ 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 ГКБ в 300 мл.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ГКБ 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 ГКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают «зарост фильтров».

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по применению
«Метод выявления и определения количества глюкозоположительных
колиформных бактерий в питьевой воде»

	стр.
Глава 1 Назначение и область применения.....	2
Глава 2 Оборудование, материалы и питательные среды.....	2
Глава 3 Подготовка к микробиологическому анализу.....	5
Глава 4 Отбор и подготовка проб	6
Глава 5 Проведение санитарно-гигиенических исследований.....	7

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая инструкция разработана специалистами государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Н.В.Дудчик, О.Е.Шедикова, Е.А.Будкина, Е.В.Дроздова).
2. Утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 2010 г., регистрационный №
3. Введена впервые.