

Микробиологический мониторинг – важный инструмент эпидемиологического надзора при решении вопросов гигиены воды и санитарной охраны водоемов. Целью санитарно-микробиологических исследований воды является ее гигиеническая оценка с точки зрения инфекционной опасности для человека. Основным критерием эпидемической безопасности является отсутствие патогенных микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний. Текущий санитарно-микробиологический контроль над водными объектами наряду с индикацией отдельных патогенных микроорганизмов включает косвенные приемы, в основу которых положены учет общего количества сапрофитных бактерий и определение степени загрязнения экскретами человека и животных по санитарно-показательным микроорганизмам. В пособии отражены нормативы санитарного законодательства РФ и методы санитарно-микробиологического контроля качества питьевой воды в отношении ее эпидемической безопасности. Представлен список методов контроля, методических указаний, санитарных правил. Адаптировано для школьников старших классов, студентов биологических специальностей.



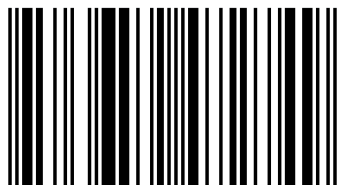
Марина Сидоренко
Любовь Бузолева



Марина Сидоренко

Сидоренко Марина Леонидовна, к.б.н., старший научный сотрудник, Биолого-почвенный институт ДВО РАН, НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток. Бузолева Любовь Степановна, д.б.н., профессор, НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток.

Анализ воды по микробиологическим показателям



978-3-659-47274-9

 **LAMBERT**
Academic Publishing

**Марина Сидоренко
Любовь Бузолева**

Анализ воды по микробиологическим показателям

**Марина Сидоренко
Любовь Бузолева**

**Анализ воды по
микробиологическим показателям**

LAP LAMBERT Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-47274-9

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Глава 1. Гигиенические требования и нормативы качества питьевой воды	5
Глава 2. Методы санитарно-микробиологического контроля	7
2.1. Отбор, хранение и транспортирование проб	7
2.2. Оборудование расходные материалы, реактивы, питательные среды	9
2.3. Приготовление питательных сред и реактивов	13
2.4. Подготовка к анализу	19
2.5. Проведение анализа	21
2.5.1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре	21
2.5.2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации (основной метод)	22
2.5.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом	29
2.5.4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий	33
2.5.5. Определение колифагов	35
Глава 3. Методы лабораторного контроля эффективности обеззараживания сточных вод	43
3.1. Общие положения	43
3.2. Метод определения общих колиформных бактерий в сточных водах	46
3.3. Метод определения сальмонелл в сточных водах	50
3.4. Метод определения колифагов в сточных водах	51
Глава 4. Контроль качества санитарно-микробиологических исследований воды	53
4.1. Общие положения	53
4.2. Требования к подготовке лабораторной посуды	55

4.3. Правила приготовления серийных разведений	60
5. Приложения	65
5.1. Термины и определения	65
5.2. Рекомендуемая литература	67

ВВЕДЕНИЕ

Микробиологический мониторинг – важный параметр эпидемиологического надзора при решении вопросов гигиены воды и санитарной охраны водоемов. Своевременное обнаружение бактериального загрязнения воды является необходимым условием для правильной организации противоэпидемических и общеоздоровительных мероприятий. Следует заметить, что ценность эпизодических наблюдений над бактериальной загрязненностью воды сравнительно невелика. Требуются систематические исследования по сезонам года с очень строгим соблюдением принятой методики. Отклонения от нее затрудняют сравнение результатов с данными других исследователей, полученными при изучении различных водоемов или даже того же водоема в разных створах.

Целью санитарно-микробиологических исследований воды является ее гигиеническая оценка с точки зрения инфекционной опасности для человека. Непосредственная индикация возбудителей заболеваний достоверно свидетельствует о наличии эпидемической ситуации, вскрывает эпидемические связи при массовых заболеваниях, объясняет происхождение вспышек и определяет специфичность последующих противоэпидемических мероприятий.

Бактериологические методы исследования являются прямыми показателями загрязнения воды хозяйственно-фекальными сточными водами и поэтому нашли самое широкое применение в практике санитарной оценки открытых пресных водоемов, а так же в системах питьевого водоснабжения.

Основным критерием эпидемической безопасности является отсутствие патогенных микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний. Согласно действующим санитарным правилам по охране поверхностных вод от загрязнения, индикаторными микробиологическими показателями эффективности обеззараживания являются:

- общие колиформные бактерии (лактозоположительные кишечные палочки), как микробиологические показатели, характеризующие уровень фекального загрязнения сточных вод и степень вероятности присутствия возбудителей бактериальных кишечных инфекций;
- колифаги, как индикаторы вирусного загрязнения хозяйственно - бытовых сточных вод.

В качестве индикаторных микроорганизмов в ряде стран рекомендуется использовать термотолерантные (фекальные) колиформные бактерии, *E.coli*, фекальные стрептококки.

Текущий санитарно-микробиологический контроль над водными объектами наряду с индикацией отдельных патогенных микроорганизмов включает косвенные приемы, в основу которых положены учет общего количества сапрофитных бактерий и определение степени загрязнения экскретами человека и животных по санитарно-показательным микроорганизмам. Динамику развития сапрофитных микроорганизмов используют в качестве косвенного показателя присутствия в воде легкоусвояемых органических веществ в количествах, которые удается обнаружить обычными методами санитарно-химического анализа. Надежный контроль потенциальной опасности загрязнения возможен только по санитарно-показательным микроорганизмам, постоянно выделяемым человеком и животными, которые могут стать источником инфекции. Уровень микробного загрязнения нормируется по установленной величине косвенных показателей. Эти нормативы отражены в документах санитарного законодательства.

Глава 1. Гигиенические требования и нормативы качества питьевой воды

Гигиенические требования и нормативы качества питьевой воды определяются требованиями СанПиН 2.1.4.559-96 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества" и СанПиН 2.1.4.544-96 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды при нецентрализованном водоснабжении. Контроль качества"

При исследовании микробиологических показателей качества питьевой воды в каждой пробе проводится определение термотолерантных колиформных бактерий, общих колиформных бактерий, общего микробного числа и колифагов.

Безопасность питьевой воды в эпидемическом отношении определяется ее соответствием нормативам по микробиологическим показателям, представленным в таблице 1.

Таблица 1

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл ¹⁾	Отсутствие
Общие колиформные бактерии ²⁾	Число бактерий в 100 мл ¹⁾	Отсутствие
Общее микробное число ²⁾	Число образующих колонии бактерий в 1мл	Не более 50
Колифаги ³⁾	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий ⁴⁾	Число спор в 20 мл	Отсутствие

Примечания:

1) При определении проводится трехкратное исследование по 100 мл отобранной пробы воды.

2) Превышение норматива не допускается в 95% проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 месяцев, при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

3) Определение проводится только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

4) Определение проводится при оценке эффективности технологии обработки воды.

При обнаружении в пробе питьевой воды термотолерантных колиформных бактерий и (или) общих колиформных бактерий, и (или) колифагов проводится их определение в повторно взятых в экстренном порядке пробах воды. В таких случаях для выявления причин загрязнения одновременно проводится определение хлоридов, азота аммонийного, нитратов и нитритов.

При обнаружении в повторно взятых пробах воды общих колиформных бактерий в количестве более 2 в 100 мл и (или) термотолерантных колиформных бактерий, и (или) колифагов проводится исследование проб воды для определения патогенных бактерий кишечной группы и (или) энтеровирусов.

Исследования питьевой воды на наличие патогенных бактерий кишечной группы и энтеровирусов проводится также по эпидемиологическим показаниям по решению центра госсанэпиднадзора.

Исследования воды на наличие патогенных микроорганизмов могут проводиться только в лабораториях, имеющих разрешение для работы с возбудителями соответствующей группы патогенности и лицензию на выполнение этих работ.

Глава 2. Методы санитарно-микробиологического контроля

Методы санитарно-микробиологического контроля качества питьевой воды в отношении ее эпидемической безопасности устанавливаются методическими указаниями (МУК 4.2.1018-01) «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

2.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ

Общие требования к отбору проб:

- Отбор проб производит специалист после прохождения инструктажа по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа.
- Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов.
- Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Многоразовая посуда, в т.ч. пробки, должна выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.
- При отборе проб в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для бактериологических исследований. Если отбирают воду после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, вносят до стерилизации натрий серноватисто-кислый в виде кристаллов из расчета 10 мг на 500 мл воды.
- Пробу отбирают в стерильные емкости. Емкость открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным

колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду запрещается.

- При исследовании воды из распределительных сетей отбор проб из крана производят после предварительной его стерилизации обжиганием и последующего спуска воды не менее 10 мин при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды может быть уменьшен. Пробу отбирают непосредственно из крана без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок. Если через пробоотборный кран происходит постоянный излив воды, отбор проб производят без предварительного обжига, не изменяя напора воды и существующей конструкции (при наличии силиконовых или резиновых шлангов). При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком.
- Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб воды с указанием места, даты, времени забора, фамилии специалиста, отбравшего пробу, и другой информации.

Хранение и транспортирование проб:

- Доставку проб питьевой воды осуществляют в контейнерах - холодильниках при температуре 4 - 10⁰С. В холодный период года контейнеры должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При соблюдении указанных условий срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 часов.
- Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2 ч после забора.
- Если не может быть соблюдено время доставки пробы и температура хранения, анализ пробы проводить не следует.

- Пробы питьевой воды должны доставляться в отдельных продезинфицированных контейнерах.

2.2. ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Оборудование:

- Термостат для температурного режима $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Термостат для температурного режима $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Термостат или водяная баня для температурного режима $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Водяная баня для температурного режима $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (рис.3)
- Водяная баня или термостат для температурного режима $45 - 49^{\circ}\text{C}$ (для питательных сред)
- Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разрежения 0,5 - 1,0 атм.
- Весы лабораторные общего назначения 4 класса точности, с пределом взвешивания до 1000 г (ГОСТ 24104-80)
- Максимальный термометр ртутный с диапазоном измерения от 20 до 200°C с ценой деления шкалы 1°C
- Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100°C с ценой деления шкалы $0,5^{\circ}\text{C}$
- рН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до 0,01
- Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже ГОСТ 6709-72
- Стерилизатор суховоздушный для температурного режима $(180 \pm 5)^{\circ}\text{C}$
- Стерилизатор паровой
- Холодильник бытовой электрический

- Вытяжной шкаф для работы с хлороформом при проведении анализа на колифаги
- Нагревательный прибор для варки питательных сред либо магнитные мешалки с подогревом до 300⁰С
- Прибор для счета колоний бактерий
- Лупа с двукратным увеличением
- Дозаторы для разлива питательных сред
- Дозаторы пипеточные
- Облучатель бактерицидный
- Оптический стандарт мутности на 10 ед.
- Горелки газовые или спиртовки
- Петли бактериологические
- Поплавки бактериологические
- Пинцеты для работы с мембранными фильтрами
- Штативы для пробирок
- Емкости эмалированные

Расходные материалы:

- Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм и другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества.
- Индикаторы бумажные для определения pH в диапазоне 6-8 с интервалом определения 0,2 - 0,3.
- Фольга алюминиевая, колпачки силиконовые, металлические
- Пипетки вместимостью 1, 5, 10 мл с ценой деления 0,1 мл (многоразового или одноразового использования) (ГОСТ 29227-91).
- Пробирки (многоразового или одноразового использования) (ГОСТ 25336-82).

- Цилиндры вместимостью 100, 250, 500 мл или мензурки вместимостью 250, 500, 1000 мл (ГОСТ 1770-74).
- Чашки бактериологические (Петри) (ГОСТ 23932-90).
- Воронки стеклянные (ГОСТ 25336-82).
- Пробки (силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием).
- Бумага фильтровальная лабораторная (ГОСТ 12026-76).
- Вата хлопковая медицинская гигроскопическая (ГОСТ 5556-81).
- Марля медицинская (ГОСТ 9412-77).
- Карандаши или фломастеры по стеклу
- Лейкопластырь
- Перчатки резиновые

Химические реактивы:

- Все химические реактивы должны соответствовать квалификации не ниже ч.д.а. (<*> Вещества обладают канцерогенным и мутагенным действием, работа с ними требует соблюдения мер предосторожности.)
- Железо серно-кислое закисное 7-водное (ГОСТ 4148-78)
- Бромтимоловый синий (ТУ 6-09-20-86-77)
- Кислота соляная (ГОСТ 3118-77)
- Натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) 5-водный (ГОСТ 27068-86)
- Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77)
- Натрий гидрат окиси (ГОСТ 4328-77)
- Калий гидрат окиси (ГОСТ 24363-80)
- Спирт этиловый ректификованный медицинский (ГОСТ 5962-67)
- Спирт этиловый технический (ГОСТ 18300-87)
- Глюкоза (ГОСТ 6038-79)
- Лактоза (ГОСТ 6038-74)
- Натрий сернисто-кислый (сульфит натрия) (ГОСТ 903-76)

- альфа-нафтол <*> (ГОСТ 5838-79)
- Розоловая кислота
- Фенилендиаминовые соединения <*> (тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлорид, диметил-п-фенилендиамин соляно-кислый)
- Фуксин основной <*> (ТУ 6-09-4119-75)
- Хлороформ технический <*> (ГОСТ 20015-76)
- Стрептомицин стерильный
- Йод кристаллический (ГОСТ 4159-64)
- Калий йодистый (ГОСТ 4232-65)
- Генциан фиолетовый кристаллический
- Фенол (ГОСТ 6417-72)

Питательные среды:

- Агар Эндо сухой
- Агар микробиологический (ГОСТ 17206-84)
- Агар питательный сухой (ТУ 42-14-33-75)
- Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой или среда Гисса с лактозой
- Сухой питательный бульон
- Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей (ГОСТ 13805-76)
- Системы индикаторные бумажные (СИБ): СИБ-лактоза и СИБ-оксидаза.

Допускаются к использованию коммерческие питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации производства зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29000. При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Все обезвоженные коммерческие питательные среды и препараты отечественного производства должны иметь сертификат соответствия.

Тест-культуры микроорганизмов

- Контрольный колифаг MS2, штамм ВКПМ-3254 E.coli K12 FRStr получают в ГНИИ Генетика - Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ - Россия, 113545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1).
- Штамм E.coli M17-02 и один из штаммов: Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas fluorescens получают в Государственном национальном органе контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Минздрава России (Россия, 121002, г. Москва, ул. Сивцев Вражек, д. 41).
- Примечание. В производственных лабораториях, расположенных на территории водопроводных станций, следует использовать штамм Pseudomonas fluorescens.

2.3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

Общие положения:

- Предпочтительно использование стандартизованных сухих питательных сред промышленного производства.
- При использовании промышленных сухих питательных сред их приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке.
- В этом случае следует соблюдать способ применения и срок хранения питательных сред, указанные на упаковках.
- Сухие питательные среды хранят в сухих помещениях, в темноте, при комнатной температуре. Открытые упаковки тщательно закупоривают.
- Среды с измененным внешним видом (уплотненные, с комками), а также с истекшим сроком годности не используют.

- Для приготовления растворов, реактивов и питательных сред применяют воду дистиллированную по ГОСТу 6709-72.
- Питательные среды готовят в посуде из инертного материала.
- Учитывая возможное изменение рН питательных сред после кипячения и стерилизации, окончательный контроль рН проводят в готовой среде при температуре 25⁰С с использованием индикаторной бумаги.
- После стерилизации питательные среды оставляют для охлаждения при комнатной температуре. При необходимости розлива в чашки Петри среды охлаждают до температуры 50 – 60⁰С.
- Температура сред, хранящихся в холодильнике, перед посевом должна быть доведена до комнатной.

Питательный бульон

- Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.
- Питательный бульон (десятикратный) для колифагов готовят путем увеличения в 10 раз навески сухого препарата, указанной на этикетке.

Питательный агар

- Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.
- Питательный агар для определения колифагов прямым методом готовят, увеличивая навеску сухого препарата в 2 раза от прописи.
- Питательный агар запрещается выдерживать в расплавленном состоянии более 8 ч. Оставшийся неиспользованным агар повторному расплавлению не подлежит.
- Полужидкий питательный агар готовят следующим образом: сухой питательный бульон (15 г) и агар микробиологический (3 г) растворить при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды. Довести рН до 7,0 -

7,2, разлить в пробирки и стерилизовать автоклавированием при 121⁰С в течение 15 мин.

- Питательный агар со стрептомицином готовят из расчета содержания 100 мкг стрептомицина на 1 мл питательного агара, приготовленного по стандартной прописи. Стерильно на стерильной дистиллированной воде готовят раствор стрептомицина в концентрации 10 мг на 1 мл. В готовый питательный агар, отмеренный по объему и остуженный до температуры 45 – 49⁰С, вносят приготовленный стерильный раствор стрептомицина из расчета 0,1 мл на 10 мл питательного агара. Разливают в пробирки для приготовления скошенного агара. Повторное расплавление питательной среды со стрептомицином запрещается.

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.
- Повышение дифференцирующих свойств сред. Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60 – 70⁰С 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 мес.
- Модификация среды с добавлением розоловой кислоты. В случаях, когда мембранные фильтры зарастают микрофлорой, не относящейся к бактериям кишечной группы, помимо фуксина, допускается добавление на 100 мл среды Эндо 0,2 мл 5%-ного спиртового раствора розоловой кислоты. Срок хранения раствора розоловой кислоты - не более 1 мес.

Модификацию среды Эндо с добавлением розоловой кислоты используют только при работе методом мембранной фильтрации.

Лактозо-пептонная среда

- 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. После растворения ингредиентов устанавливают pH 7,4 - 7,6, разливают по 10 мл в пробирки, стерилизуют при $112 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 12 мин.
- Для приготовления концентрированной лактозо-пептонной среды все ингредиенты, кроме воды, увеличивают в 10 раз, разливают по 1 мл в пробирки и по 10 мл во флаконы.

Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу до кислоты и газа

- Полужидкая среда с лактозой из сухого препарата. Готовят по способу, указанному на этикетке. Срок хранения - не более 2 недель при комнатной температуре. Посев производят уколом до дна пробирки. При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется в соответствии с использованным индикатором. При газообразовании газ скапливается или по уколу, или на поверхности, или в толще среды появляются разрывы. При инкубации посевов более 5 ч газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды "карманы" - потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.
- Полужидкая среда с лактозой. Готовят при отсутствии сухого препарата. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 4 - 5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают pH 7,2 - 7,4, добавляют 1 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при $120 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные

пробирки на высоту 3 - 5 см и стерилизуют при $112 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 12 мин. 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. Готовят так же как лактозо-пептонная среда с добавлением 1 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего на 1 л и разливают по 3 - 5 мл в пробирки с поплавком.
- СИБ-лактоза. Готовят по прописи завода-изготовителя.

Реактивы для оксидазного теста

- Вариант 1. 1%-ный водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорид. Готовят перед употреблением.
- Вариант 2.

Реактив N 1. 1%-ный спиртовой раствор альфа-нафтола.

Реактив N 2. 1%-ный водный раствор фенилендиаминового соединения.

Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: 1 - до одного месяца, 2 - до одной недели. Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора. Могут быть использованы коммерческие тест-системы для постановки оксидазного теста (СИБ-оксидаза или аналоги).

Перед работой с каждой серией проб реактивы или тест-системы на оксидазу следует испытывать с тест-культурами микроорганизмов, дающих положительную (*Ps.aeruginosa*, *Ps.fluorescens*) и отрицательную оксидазную реакцию (*E.coli*).

Железосульфитный агар

В 1000 мл стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10г глюкозы, нагревают до растворения, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при $112 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 12 мин. (основная среда).

20%-ный раствор сульфита натрия (Na_2SO_3) и 8%-ный раствор железа серно-кислого закисного (FeSO_4) или железа хлористого (FeCl_2) 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%-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8%-ного раствора серно-кислого железа, перемешивают и стерильно разливают в пробирки высоким столбиком 12 - 15 см для работы методом мембранной фильтрации или во флаконы для работы методом прямого посева.

Реактивы для окраски препаратов по Граму

- Карболовый раствор генциана фиолетового готовят следующим образом: 1 г генциана фиолетового, 10 мл ректификованного этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.
- Раствор Люголя готовят следующим образом: 1 г йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Хранить во флаконе из темного стекла.
- Фуксин Циля готовят следующим образом: 1 г основного фуксина, 10 мл спирта этилового ректификованного, 54 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 мл дистиллированной воды.

2.4. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Подготовка посуды и материалов.

Лабораторную посуду моют, ополаскивают сначала водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают.

Пробирки, колбы, бутылки, флаконы закрывают силиконовыми или ватно-марлевыми пробками и колпачками (силиконовые, металлические, из фольги или плотной бумаги).

Пипетки со вставленными тампонами из ваты укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу.

Чашки Петри укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации.

Подготовленную посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 160⁰С в течение 2 ч или при 180⁰С 1 ч, считая с момента достижения указанной температуры. Стерильную посуду вынимают из стерилизационного шкафа после его охлаждения ниже 60⁰С. Срок хранения стерильной посуды - не более 10 дней.

Материалы и лабораторную посуду, разрушающиеся при температуре 160 - 180⁰С (резина и т.п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре 121 ± 2⁰С 20 мин.

Новые резиновые пробки кипятят в 2%-ном растворе натрия двууглекислого 30 мин. и 5 раз промывают водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят в дистиллированной воде 30 мин., высушивают, заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют в паровом стерилизаторе. Резиновые пробки, использованные ранее, обеззараживают, кипятят 30 мин. в водопроводной воде с нейтральным моющим средством, промывают в водопроводной воде, высушивают, монтируют и стерилизуют.

После выполнения анализа все использованные чашки, пробирки и пипетки обеззараживают в автоклаве при $126 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, в исключительных случаях допускается обеззараживание кипячением в 2%-ном растворе пищевой соды или 0,5%-ном растворе моющего средства в течение 60 мин с момента закипания (в закрытой емкости с полным погружением в раствор).

Подготовка проб воды

Перед посевом пробу тщательно перемешивают и фламбируют горящим тампоном край емкости. Используемые пробирки и чашки маркируют.

Перед каждым отбором новой порции воды для анализа пробу перемешивают стерильной пипеткой.

Подготовка мембранных фильтров.

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

Подготовка фильтровального аппарата.

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

Фильтрация воды.

В воронку прибора для фильтрации 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 проб обеззараженной воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы.

При фильтровании 1 мл 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, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева. На одну чашку можно поместить 3 - 4 фильтра с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

2.5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.5.1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре

- Определение понятия показателя. Метод определяет в питьевой воде общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (ОМЧ), способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37⁰С в течение 24 ч, видимые с увеличением в 2 раза.
- Выполнение анализа. Из каждой пробы делают посев не менее двух объемов по 1 мл. После тщательного перемешивания пробы воды вносят по 1 мл в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. После внесения воды в каждую чашку вливают 8 - 12 мл (на чашку диаметром 90 - 100 мм) расплавленного и остуженного до 45 - 49⁰С

питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара. Расплавленный агар на период проведения анализа помещают в водяную баню или термостат, поддерживающие температуру 45 - 49⁰С. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 37 ± 1⁰С в течение 24 ± 2 ч.

- Учет результатов. Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Учитывают только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний. Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды. Если на одной из 2 чашек подсчет невозможен, результат выдают на основании учета колоний на одной чашке. Если на двух чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющийся на всю поверхность чашки, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают сектор чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечают "число КОЕ/мл - ориентировочно". Если подсчет колоний на чашках невозможен, то в протоколе отмечают "сплошной рост".

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

- Определение понятия показателя. Общие колиформные бактерии (ОКБ) - грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре

$37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 - 48 ч. Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч.

- Принцип метода. Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциальной питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

- Выполнение анализа

Порядок исследования. При исследовании питьевой воды анализируют 3 объема по 100 мл. При получении стабильных отрицательных результатов допустима фильтрация 300 мл воды через один фильтр. При фильтрации воды неизвестного качества целесообразно увеличение количества фильтруемых объемов для получения изолированных колоний на фильтре (например, 10, 40, 100, 150 мл воды).

Отмеренный объем воды фильтруют через мембранные фильтры. Фильтры помещают на среду Эндо. Чашки с фильтрами ставят в термостат дном вверх и инкубируют посеvy при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

Если на фильтрах нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, выдают отрицательный ответ: отсутствие ОКБ и ТКБ в 100 мл исследуемой воды. Анализ заканчивают через 24 ч.

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 приступают к подтверждению их принадлежности к ОКБ и ТКБ.

Для подтверждения наличия ОКБ исследуют:

- все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний;
- 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;
- принадлежность к Граму (микроскопия окрашенного по Грамму препарата или постановка теста Греггерсена);
- ферментацию лактозы до кислоты и газа.

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 мин. появляется фиолетово - коричневое или синее окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. При положительном результате эту колонию из дальнейшего исследования исключают.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо пересеять культуру со среды Эндо на питательный агар. После инкубации тест повторяют.

Определение принадлежности к Граму

Из оксидазоотрицательной колонии делается мазок (рис. 1), окрашивается по Граму и микроскопируется. На обезжиренное спиртом

предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют 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 карболовый раствор генциана фиолетового на 0,5 - 1 мин., снимают бумагу, наливают раствор Люголя на 0,5 - 1 мин., сливают раствор Люголя и стекло промывают в этиловом спирте в течение 0,5 - 1 мин., пока не перестанет отходить краситель. Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1 - 2 мин. фуксином Циля, разведенным 1:10 дистиллированной водой. После промывания и просушивания препарата мазок микроскопируют.

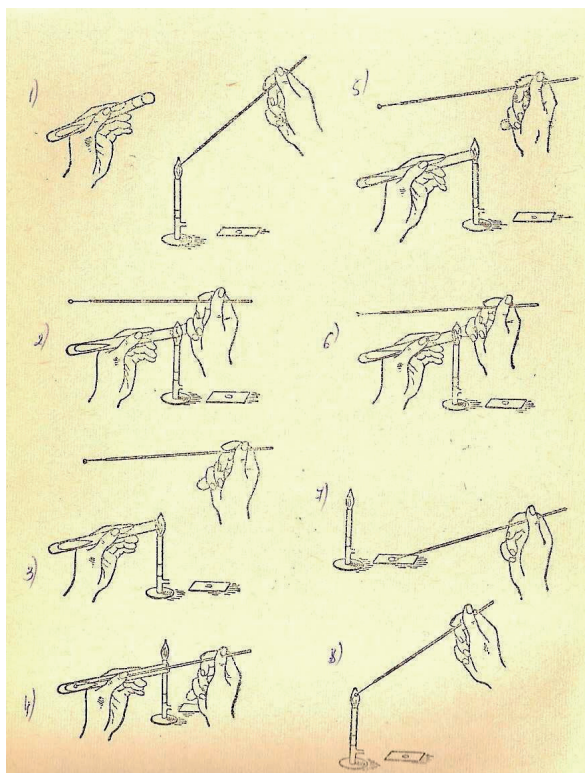


Рис. 1. Схема приготовления препарата для микроскопирования.

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные окрашиваются в синий цвет. Колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Окраска по Граму может быть заменена тестом Грегерсена, не требующим использования оптики.

Тест Грегерсена: в капле 3%-ного водного раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизнется и за петлей тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность испытуемой культуры или колонии к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются – реакция отрицательная.

Определение ферментации лактозы

Оставшуюся часть оксидазоотрицательной грамотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой :

- для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч;
- для подтверждения наличия ТКБ посев осуществляют в среду, предварительно прогретую до температуры $43 - 44^{\circ}\text{C}$, и инкубируют при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч.

Первичный учет образования кислоты и газа на подтверждающих полужидких средах и СИБ возможен через 4 - 6 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами для окончательного учета ТКБ оставляют до 24 ч. Пробирки с посевами для

подтверждения наличия ОКБ после просмотра через 24 ч и получения отрицательного результата оставляют для окончательного учета до 48 ч.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, ее пересевают на скошенный питательный агар и после инкубации в течение 18 - 24 ч выполняют все необходимые подтверждающие тесты.

Постановка подтверждающих тестов при наложении колоний или сплошном росте.

Если на части или на всей поверхности фильтра наблюдается наложение колоний или сплошной рост, выполняют оксидазный тест путем помещения мембранного фильтра на кружок фильтровальной бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом, или на диск СИБ-оксидаза, смоченный дистиллированной водой. При появлении первых признаков реакции, но не более чем через 5 мин., мембранный фильтр переносят обратно на среду Эндо. После четкого проявления реакции определяют результат. При появлении фиолетово-коричневого или синего окрашивания (в зависимости от примененного реактива) оксидазный тест считают положительным.

Если на фильтрах все колонии оксидазоположительные, они не учитываются, и выдают ответ об отсутствии ОКБ и ТКБ и завершают анализ.

При отрицательной оксидазной реакции проводят рассев до получения изолированных колоний и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ .

- Учет результатов. Грамотрицательные колонии учитываются как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при температуре 37⁰С с образованием кислоты и газа. Грамотрицательные колонии учитываются как ТКБ при отрицательном оксидазном тесте и

ферментации лактозы при температуре 44⁰С с образованием кислоты и газа. При отсутствии общих и термотолерантных колиформных бактерий на всех фильтрах результат записывают "не обнаружено КОЕ ОКБ в 100 мл" и "не обнаружено КОЕ ТКБ в 100 мл". В случае идентификации всех выросших подозрительных колоний число колониеобразующих единиц ОКБ и ТКБ подсчитывают на всех фильтрах и выражают результат анализа КОЕ в 100 мл воды.

Вычисление проводят по формуле 1:

$$X = \frac{a \times 100}{V},$$

где: X - число колоний в 100 мл; V - профильтрованный объем воды через фильтры, на которых велся учет; а - число подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

Примеры:

1. При посеве 3 фильтров по 100 мл выросло две колонии в 100 мл, на остальных двух фильтрах нет роста. Число общих или термотолерантных колиформных бактерий будет:

$$\frac{2 \times 100}{300} = 0,7 \text{ КОЕ ОКБ (ТКБ) в 100 мл.}$$

2. При посеве 10, 40, 100 и 150 мл на фильтрах с профильтрованным объемом 40 мл выросло 4 изолированные колонии, с профильтрованным объемом 100 - 3 ОКБ. Фильтры с объемами 10 мл и 150 мл заросли и учету не подлежат. Суммируют общее число колоний ОКБ (ТКБ) на тех фильтрах, где получены изолированные колонии, и пересчитывают на объем 100 мл.

$$\frac{(4 + 3) \times 100}{(40 + 100)} = 5 \text{ КОЕ в 100 мл.}$$

Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то вычисляют числа ОКБ или ТКБ среди колоний этого типа по формуле 2:

$$X = \frac{(a \times c)}{b},$$

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 формулам 1 и 2. Окончательный результат выдают: количество КОЕ ОКБ в 100 мл, из них количество КОЕ ТКБ в 100 мл. Ориентировочный результат может быть выдан при обнаружении типичных колиформных колоний на среде Эндо, образованных грамтрицательными оксидазоотрицательными бактериями. Окончательный ответ подтверждается по результатам ферментации лактозы.

При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ и ТКБ выдается качественный результат "обнаружено ОКБ в 100 мл".

Если все колонии на фильтре оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершается, в протоколе отмечают "зарост фильтров".

В обоих случаях анализ повторяют.

2.5.3. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

- Область применения. Титрационный метод может быть использован:
 - при отсутствии материалов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации;
 - при анализе воды с большим содержанием взвешенных веществ;

- в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиформных бактерий.

- Принцип метода. Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциальную плотную питательную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.
- Выполнение анализа. При исследовании питьевой воды качественным методом (текущий санэпиднадзор, производственный контроль) засевают 3 объема по 100 мл.

При исследованиях воды с целью количественного определения ОКБ и ТКБ при повторном анализе производят посев: 3 объемов по 100 мл, 3 объемов по 10 мл, 3 объемов по 1 мл.

Каждый объем исследуемой воды засевают в лактозо-пептонную среду. Посев 100 мл и 10 мл воды производят в 10 и 1 мл концентрированной лактозо-пептонной среды, посев 1 мл пробы проводят в 10 мл среды обычной концентрации.

Посевы инкубируют при $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч. Не ранее 24 ч инкубации проводят предварительную оценку посевов. Из емкостей, где отмечено наличие роста (помутнение) и образование газа, производят высев бактериологической петлей на сектора среды Эндо для получения изолированных колоний.

Емкости без наличия роста и образования газа оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными, и дальнейшему исследованию они не подлежат. Из емкостей, где отмечено помутнение и образование газа или только помутнение, делают высев на сектора среды Эндо.

Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18 - 20 ч.

При образовании помутнения и газа в среде накопления и росте на среде Эндо колоний, типичных для лактозоположительных бактерий: темно-красных или красных, с металлическим блеском или без него, выпуклых с красным центром и отпечатком на питательной среде, дают положительный ответ на присутствие общих колиформных бактерий в данном объеме пробы.

Наличие ОКБ требуется подтвердить:

- если в среде накопления отмечено только помутнение;
- если принадлежность к лактозоположительным колониям вызывает сомнение у исследователя.

В этих случаях:

- проверяют наличие отпечатка на среде Эндо после снятия петлей подозрительной колонии;
- выполняют оксидазный тест;
- подтверждают принадлежность к Граму;
- подтверждают способность к газообразованию при посеве изолированных 1 - 2 колоний каждого типа с каждого сектора на среду с лактозой по п. 5.6 с последующей инкубацией посевов при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 - 48 ч.

При отсутствии изолированных колоний проводят рассев на среду Эндо общепринятыми бактериологическими методами.

Отрицательный ответ дают, если:

- в среде накопления нет признаков роста;
- на секторах среды Эндо нет роста;
- на секторах среды Эндо выросли не характерные для колиформных бактерий колонии (прозрачные с неровными краями, расплывчатые и т.п.);
- все колонии оказались оксидазоположительными;
- все колонии оказались грамположительными;

- если в подтверждающем тесте на среде с углеводом не отмечено газообразования.

Для определения термотолерантных колиформных бактерий работают с секторами среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии. Делают посев 2 - 3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с любой из лактозных сред.

Среду перед посевом нагревают на водяной бане или в термостате до 44°C . Немедленно после посева пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Допускается просмотр посевов через 4 - 6 ч.

При образовании газа в среде накопления, росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24 ч при температуре 44°C дают положительный ответ на наличие в этом объеме пробы воды ТКБ. Во всех остальных случаях дают отрицательный ответ.

Допустимо для ускорения выдачи ответа на присутствие ТКБ производить высев 1 мл из объемов среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование, в пробирке с лактозо-пептонной средой с поплавком и прогретой предварительно до температуры 44°C . Посевы выдерживают в термостате при температуре $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

- Учет результатов. При исследовании 3 объемов по 100 мл результаты оцениваются качественно, и при обнаружении ОКБ и ТКБ хотя бы в одном из 3 объемов делается запись в протоколе "обнаружены в 100 мл". Результат сообщают без доверительного интервала. При отрицательном ответе на наличие ОКБ и ТКБ во всех исследованных объемах выдают заключение в протоколе "не обнаружены в 100 мл".

2.5.4. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий

Сульфитредуцирующие клостридии - спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16 - 18ч.

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

- Выполнение анализа. Пробу воды 20 мл прогревают на водяной бане в пробирках при температуре $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. для исключения вегетативных форм. При исследовании хлорированной воды прогревание пробы можно не производить. Из каждой пробы питьевой воды делают посев или фильтруют 20 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.

Определение методом фильтрования в пробирках.

Перед посевом пробирки с железосульфитным агаром расплавляют на водяной бане (не кипятить!). В течение посева поддерживают среду нагретой до $70 - 80^{\circ}\text{C}$ в водяной бане. После фильтрования установленного объема воды мембранный фильтр фламбированным пинцетом берут за два противоположных края и согнутый в виде трубочки помещают в пробирку с горячим агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки. Сразу же после посева пробирку с агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охлаждают, помещая в емкость с холодной водой. Культивируют посеvy при $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16 - 18 ч.

Определение методом фильтрования в чашках Петри.

Чашки Петри диаметром 55 - 60 мм заливают тонким слоем железосульфитного агара. После фильтрации фильтр поместить

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 $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16 - 18 ч.

Определение прямым посевом

Готовят железосульфитный агар во флаконах и пробу воды. В стерильные пробирки вносят по 10 мл в 2 пробирки (объемом не менее 30 мл) или по 5 мл в 4 пробирки (объемом по 15 мл).

Посевы заливают горячим железосульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливать по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирку быстро охлаждают, помещая ее в емкость с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 16 - 18 ч.

- Учет результатов.

Количественному учету подлежат только те посеvy, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие как на фильтрах, так и в толще питательной среды. Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды. При отсутствии роста черных колоний на всех фильтрах дают ответ "не обнаружено в 20 мл воды". При невозможности учета колоний из-за сливного роста результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают "обнаружено в 20 мл". При необходимости получения количественного результата анализ повторяют.

2.5.5. Определение колифагов

Колифаги - бактериальные вирусы, способные лизировать *E.coli* и формировать при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ через 18 ± 2 ч зоны лизиса бактериального газона (бляшки) на питательном агаре.

- Титрационный метод определения колифагов.

Определение колифагов в питьевой воде заключается в предварительном накоплении колифагов в среде обогащения на культуре *E.coli* и последующем выявлении зон лизиса (просветления) газона *E.coli* на питательном агаре. Метод предназначен для проведения текущего контроля качества питьевой воды.

Подготовка тест-культуры *E.coli* K12 Str .

На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь, приготовленную следующим образом: культуру *E.coli* засевают в пробирку со скошенным питательным агаром со стрептомицином. Через 18 ± 2 ч инкубации при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ произвести смыв бактерий с косяка 5 мл стерильного физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl) и по стандарту мутности готовят взвесь *E.coli* в концентрации 10 бактериальных клеток в 1 мл.

Допускается использование 4-часовой бульонной культуры *E.coli*, полученной путем подращивания в термостате при температуре 37°C . Концентрация 10 бактериальных клеток *E.coli* содержится в 2 мл.

Проведение качественного анализа.

В исследуемую пробу воды объемом 100 мл вносят 10 мл 10-кратного питательного бульона и 1 мл подготовленного смыва тест-культуры или 2 мл 4-часовой бульонной культуры.

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий *E.coli* (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) помещают в чашку Петри и заливают питательным агаром.

Исследуемую пробу воды (100 мл) и чашку Петри с контролем *E.coli* помещают в термостат и инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч.

После инкубации из исследуемой пробы воды отливают в пробирку 10 мл и добавляют 1 мл хлороформа.

Пробирку закрывают стерильной резиновой или силиконовой пробкой, энергично встряхивают для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставляют при комнатной температуре не менее 15 мин. До полного осаждения хлороформа.

В предварительно расплавленный и остуженный до $45 - 49^{\circ}\text{C}$ питательный агар добавляют приготовленный смыв бактерий *E.coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

В стерильную чашку Петри пипеткой из пробирки переносят 1 мл обработанной хлороформом пробы (не касаясь хлороформа) и заливают смесью расплавленного и остуженного до $45 - 49^{\circ}\text{C}$ питательного агара объемом 12 - 15 мл, а также одну дополнительную чашку Петри для контроля культуры *E.coli* и осторожно покачивают для равномерного перемешивания пробы воды и агара. Для полного застывания чашки оставляют на столе при комнатной температуре на 10 мин. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат на 18 ± 2 ч при 37°C .

При выполнении серии проб ставится общий контроль для всей серии.

Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете.

Проба считается положительной при наличии полного лизиса, просветления нескольких бляшек, одной бляшки на чашке с пробой воды при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке (рис. 2).

В протоколе анализа отмечается: колифаги обнаружены или не обнаружены в 100 мл воды (результат качественный).

При наличии зон лизиса в контроле культуры результат считается недействительным.

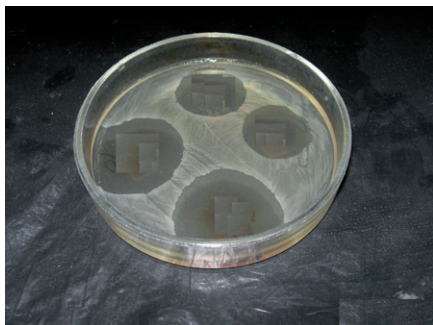


Рис. 2. Зоны лизиса бактерий на питательном агаре.

Проведение количественного анализа.

Исследуемую пробу воды в количестве 100 мл разлить на 6 объемов: 1 флакон 50 мл и 5 пробирок по 10 мл. В 50 мл пробы добавить 5 мл десятикратного питательного бульона и 0,5 мл смыва (или 1 мл 4-часовой бульонной культуры) бактерий *E.coli*. В каждые 10 мл пробы внести по 1 мл десятикратного питательного бульона и 0,1 мл смыва (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) бактерий *E.coli*.

Для контроля культуры 0,1 мл смыва бактерий (или 0,2 мл 4-часовой бульонной культуры) *E.coli* помещают в чашку Петри и заливают питательным агаром.

Посевы инкубируют при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч.

После инкубации из объема 50 мл отлить в пробирку 10 мл. Во все исследуемые 6 объемов добавить по 1 мл хлороформа. Пробирки закрыть стерильными резиновыми или силиконовыми пробками, энергично встряхнуть для равномерного распределения хлороформа по объему пробы и оставить при комнатной температуре не менее 15 мин. для осаждения хлороформа.

В предварительно расплавленный и остуженный до $45 - 49^{\circ}\text{C}$ питательный агар добавить приготовленный смыв бактерий *E.coli* из расчета 1,0 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

Приготовленную смесь разлить в чашки Петри: 1 чашку для контроля культуры *E.coli* на лизогенность и по одной чашке на каждую исследуемую пробу воды. При одновременном анализе нескольких проб воды ставится один контроль культуры *E.coli*.

После застывания агара чашки, предназначенные для посева проб, разделить на 6 секторов, промаркировать их в соответствии с исследуемыми объемами. На каждый сектор из соответствующей пробирки нанести пастеровской пипеткой (микропипеткой или бактериологической петлей продольным штрихом) по 1 капле надосадочной жидкости (без хлороформа).

После подсыхания капель чашки с исследуемыми пробами и контрольную чашку поместить в термостат при $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ на 18 ± 2 ч.

Просмотр результатов осуществляется в проходящем свете.

Учет проводится по наличию зон просветления (лизиса) на секторах газона *E.coli*.

При применении капельного способа посева пипеткой образуется зона лизиса в виде округлого пятна или отдельных бляшек. При посеве продольным штрихом бактериологической петлей отмечается лизис по ходу штриха.

Проба считается положительной при наличии зоны лизиса хотя бы на одном секторе при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат считать недействительным.

- Прямой метод определения колифагов

Определение колифагов в питьевой воде заключается в исследовании нормируемого объема воды (100 мл) путем его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на газоне *E.coli* в чашках Петри с питательным агаром. Прямой метод выделения колифагов из воды проводят

параллельно с титрационным при исследованиях по эпидемическим показаниям.

Проведение анализа

В питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45-49⁰С, добавить смыв *E.coli* из расчета 2,0 мл смыва (или 4 мл 4-часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара, перемешать. Исследуемые 100 мл воды разлить по 20 мл в большие пробирки, нагреть до 35 - 44⁰С и немедленно (не более чем через 5 мин. по достижении требуемой температуры) разлить в 5 чашек Петри и сразу же внести в каждую чашку по 20 мл смеси агара с культурой *E.coli*.

Для контроля культуры *E.coli* в одну чашку Петри внести 20 мл стерильной водопроводной воды, предварительно прогретой до 35-44⁰С, залить 20 мл приготовленного агара с *E.coli* и осторожно перемешать. Содержимое чашек осторожно перемешать и оставить при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром поместить дном вверх в термостат и инкубировать при температуре 37 ± 1⁰С в течение 18 ± 2 ч.

Просмотр посевов осуществляется в проходящем свете.

Учет результатов проводят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 5 чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

Наиболее часто зоны лизиса выглядят прозрачными пятнами на фоне газона тест-культуры питательного агара в виде круглых изолированных бляшек от 1 до 5 - 7 мм в диаметре с четко выраженными либо стертыми границами.

При высоких концентрациях фага наблюдается разная картина лизиса.

Слияние негативных колоний дает "ажурный" газон *E.coli*, рост единичных колоний *E.coli* на фоне сплошного лизиса либо полное отсутствие роста на чашке.

При прямом посеве возможен лизис, маскируемый неомогенно застывшим агаром, а также закрытый сопутствующей микрофлорой. Капли конденсата и неомогенно застывший при прямом посеве агар могут приводить к образованию артефактов на газоне *E.coli*, визуально напоминающих лизис.

Предварительный учет результатов можно проводить через 5 - 6 ч инкубации. На этом этапе при наличии четких зон лизиса может быть выдан предварительный ответ о присутствии колифагов в воде.

Окончательный количественный учет прямого посева проводится через 18 ± 2 ч. Результаты выражают количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 100 мл пробы воды.

Если отмечен сливной рост бляшек и счет затруднителен, то по данным прямого посева может быть выдан качественный результат: "обнаружено в 100 мл воды".

При получении отрицательного результата при работе прямым методом окончательный ответ выдается по результатам титрационного метода.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результат исследования считается недействительным.

- Постановка контролей

Отрицательный контроль.

Отрицательный контроль подтверждает отсутствие контаминации фагом питательных сред, лабораторной посуды, оборудования на этапах подготовки и проведения анализа, а также позволяет оценить способность тест-культуры *E.coli* давать равномерный газон.

Отрицательным контролем служит исследование стерильной водопроводной воды, проводимое аналогично анализируемой пробе воды. Так, при анализе воды титрационным методом 10 мл стерильной водопроводной воды вносят в дополнительную пробирку. При анализе воды

прямым посевом в дополнительную шестую чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды.

Дополнительные посевы исследуются на колифаги аналогично основным пробам.

При анализе серии проб отрицательный контроль может быть один на каждый вид анализа: титрационный и прямой. В этом случае постановка отрицательного контроля поэтапно осуществляется после обработки всех проб данной серии.

В случае обнаружения бляшек колифагов в чашках с отрицательным контролем результаты исследования всей серии проб воды недействительны.

Следует проверить стерильность лабораторного оборудования, посуды, питательных сред, а также повторить контрольный посев на чистоту тест-штамма *E.coli* K12 F Str .

Кратность проведения отрицательного контроля - 1 раз в день.

Методика подтверждения фаговой природы лизиса.

В сомнительных случаях при работе как титрационным, так и прямым методом необходимо провести контрольный посев на подтверждение фаговой природы лизиса.

С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара, подозрительный на колифаги, помещают его в 5 мл питательного бульона, куда добавляют каплю тест-культуры *E.coli* и инкубируют при 37⁰С в течение 16 - 18 ч. Полученную культуру обрабатывают хлороформом и исследуют на наличие фага. Высев осуществляют петлей или пипеткой на сектора питательного агара. Лизис на любом из секторов расценивается как подтверждение наличия фага.

Глава 3. Методы лабораторного контроля эффективности обеззараживания сточных вод.

Методы лабораторного контроля эффективности обеззараживания сточных вод описаны методическими указаниями МУ 2.1.5.800-99 «Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водоемов. Организация Госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод. Методика».

3.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Сточные воды являются основным источником микробного загрязнения объектов окружающей среды, в т.ч. поверхностных пресных и морских вод, подземных водоносных горизонтов, питьевой воды и почвы, что является фактором риска распространения возбудителей инфекций с фекально - оральным механизмом передачи.

К наиболее опасным в эпидемическом отношении относят следующие виды сточных вод (таблица 2):

- хозяйственно - бытовые сточные воды;
- городские смешанные (промышленно - бытовые) сточные воды;
- сточные воды инфекционных больниц;
- сточные воды от животноводческих и птицеводческих объектов и предприятий по переработке продуктов животноводства, стоки шерстомоек, биофабрик, мясокомбинатов и т.д.;
- поверхностно - ливневые стоки;
- шахтные и карьерные сточные воды;
- дренажные воды.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЧНЫХ ВОД ПО
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ
ПОКАЗАТЕЛЯМ (ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ ДАННЫЕ)

Таблица 2

№	Вид сточных вод	Микробиологические показатели				
		Общие колиформные бактерии, КОЕ/100мл	колифаги, КОЕ/100мл	Вирусы, КОЕ/100мл	Сальмонеллы, КОЕ/л	Туберкулезная палочка
1	Хозяйственно - бытовые сточные воды	$10^6 - 10^8$	$10^3 - 10^4$	до 10^3	$10^2 - 10^6$	+
2	Городские сточные воды (соотношение х/бытовых и пром. сточных вод 60:40)	$10^5 - 10^7$	$10^3 - 10^4$	до 10^3	$10^3 - 10^4$	+
3	Сточные воды животноводческих комплексов	$10^8 - 10^9$	10^7	10^7	10^5	-
4	Стоки инфекционных больниц	$10^3 - 10^5$	-	+	+	+
5	Шахтные и карьерные воды	$10^4 - 10^5$	-	До 100	-	-
6	Дренажные воды	$10^4 - 10^6$	-	-	-	-
7	Поверхностно-ливневые сточные воды	$10^5 - 10^8$	100-3000	-	-	-

Для хозяйственно - бытовых сточных вод характерно относительно стабильное качество (при соблюдении норм водопользования). Эти стоки отличаются высоким уровнем микробного загрязнения на фоне значительной концентрации взвешенных частиц и органических веществ. Поэтому перед обеззараживанием необходима их механическая и биологическая очистка.

Состав и свойства городских смешанных сточных вод (промышленно - бытовых) определяются соотношением хозяйственно - бытовых и промышленных стоков и спецификой предприятий, формирующих эти стоки.

Дополнительные трудности при их обеззараживании возникают в связи с тем, что микробное загрязнение этих вод сочетается с разнообразными органическими и неорганическими веществами, которые сами по себе могут быть как дополнительными бактерицидами и бактериостатиками, так и служить благоприятной средой для размножения микроорганизмов.

Сточные воды инфекционных больниц и отделений характеризуются небольшим объемом, неравномерностью образования и состава в течение суток, значительной обсемененностью возбудителями инфекций.

Сточные воды от животноводческих и птицеводческих комплексов имеют высокое органическое и микробное загрязнение. При подготовке этих сточных вод к обеззараживанию должно быть предусмотрено отстаивание с последующей очисткой.

Для поверхностно – ливневых вод характерна неравномерность объема по сезонам года, а уровень микробного загрязнения зависит от степени благоустройства территории.

Шахтные и карьерные сточные воды формируются из подземных и поверхностных вод, попадающих в горные выработки и загрязняющихся в процессе их эксплуатации. В этих водах высокое микробное загрязнение сочетается с наличием крупнодисперсной взвеси, которую перед обеззараживанием обычно удаляют.

Дренажные воды отличаются наличием микробного загрязнения и высоким уровнем минеральных солей.

Практически все перечисленные виды сточных вод могут содержать патогенные микроорганизмы – возбудители таких инфекций, как холера, брюшной тиф, паратиф А и В, сальмонеллез, дизентерия, вирусные гепатиты А и Е, полиомиелиты 1 – 3 типов и другие энтеровирусные и аденовирусные заболевания, амебиаз, лямблиоз, лептоспироз, бруцеллез, туляремия, туберкулез, гельминтозы, кампилобактериозы.

Интенсивная циркуляция возбудителей кишечных инфекций в воде водоемов при сбросе необеззараженных сточных вод приводит к риску

возникновения заболеваний при водопользовании населения, который возрастает в летний период при активном использовании водоемов в целях рекреации и ирригации.

В зимний период возрастает риск микробного загрязнения водоемов у мест водозаборов из-за снижения их самоочищающей способности. Следствием этого является более длительная выживаемость и сохранение вирулентных свойств патогенных микроорганизмов в холодной воде. Кроме того, одновременное ухудшение условий очистки и обеззараживания на водопроводных станциях при низкой температуре может привести к нарушению безопасности хозяйственно - питьевого водопользования населения.

3.2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩИХ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ В СТОЧНЫХ ВОДАХ

Общие положения

К общим колиформным бактериям (ОКБ) относят граммотрицательные не образующие спор палочки, не обладающие оксидазной активностью, способные расти на дифференциальных лактозных средах (типа Эндо), ферментирующие лактозу до образования альдегида, кислоты и газа при температуре 37⁰С в течение 24 часов. Общие колиформные бактерии определяют методом прямого посева на среду Эндо точно отмеренных объемов воды и методом мембранной фильтрации с последующим выращиванием посева при температуре 37⁰С в течение 18 - 24 часов и подсчетом образующих альдегид колоний.

Определение ОКБ титрационным методом не рекомендуется вследствие низкой точности получаемых результатов, большого объема работы при 2- или 3-рядовом посеве.

Условия отбора пробы, транспортировки и хранения, подготовка посуды, питательных сред, приготовление разведений должны соответствовать

методическим указаниям по санитарно -микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов и питьевой воды.

Выполнение анализа

- Готовят ряд десятикратных разведений пробы сточной воды. Объемы для посева и число разведений устанавливают в каждом конкретном случае исходя из предполагаемого уровня загрязнения с таким расчетом, чтобы получить на чашках изолированные колонии ОКБ в количестве, при котором имеет место минимальная ошибка метода - от 10 до 50 КОЕ на чашку.
- Из каждого выбранного разведения делают посев параллельно на две чашки Эндо, предварительно подсушенные, внося по 0,5 мл или по 0,1 мл на каждую из двух чашек. При посеве 0,5 мл внесенный объем распределяют по всей поверхности чашки покачиванием или стеклянным шпателем, после чего подсушивают. При отсутствии специального аппарата для подсушивания чашки с посевами помещают приоткрытыми в термостат до полного испарения воды, после чего переворачивают вверх дном. При посеве 0,1 мл посеvy растирают шпателем до полного впитывания воды, переворачивают вверх дном и ставят в термостат.
- При исследовании обеззараженной воды, когда допустимое содержание ОКБ в стоках не более 100 КОЕ/100 мл используют один из двух методов: прямого посева или мембранной фильтрации по МУ 2285-81. Прямым посевом делают высев на 4 чашки по 0,5 мл из неразведенной пробы воды. Через мембранный фильтр профильтровывают 1 мл, 2,5 мл и 5 мл. При контроле обеззараженных стоков, когда норматив не более 10 КОЕ/100 мл ОКБ, работают методом мембранной фильтрации и профильтровывают 10 мл, 25 мл и 50 мл исследуемой воды. Фильтры помещают на среду Эндо.
- Посевы инкубируют 24 часа при температуре $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Учет результатов

Подсчитывают выросшие на поверхности среды Эндо колонии, характерные для общих колиформных бактерий, ферментирующих лактозу и образующих альдегид: красные и темно - красные с металлическим блеском и без него, слизистые розовые с темно - малиновым центром. Наличие альдегида можно проверить по отпечатку на среде, если петлей отодвинуть подозрительную колонию.

В сомнительных случаях, чтобы подтвердить принадлежность колоний к ОКБ, необходимо убедиться в способности ферментировать лактозу до кислоты и газа. С этой целью делают посев на полужидкую среду с лактозой или СИБ-лактозу и инкубируют посев при температуре 37 град. С 4 - 6 часов. При образовании кислоты и газа дают положительный ответ. Если среда не изменила цвета или при наличии только кислоты, посевы ставят обратно в термостат и окончательно учитывают результат через 24 часа.

При необходимости исключить оксидазоположительную микрофлору выполняют оксидазный тест. При прямом посеве накапывают реактив на подозрительные колонии либо наносят часть колонии штрихом на полоску фильтровальной бумаги, смоченную оксидазным реактивом, или СИБ-оксидазу.

Если необходимо проверить оксидазную реакцию колоний, выросших на мембранных фильтрах, то фильтр накладывают на диск фильтровальной бумаги, обильно смоченной реактивом.

Все изменившие цвет колонии (оксидазоположительные) из учета исключают.

Приготовление реактива и техника выполнения реакции по МУК 4.2.671-97.

Подсчет и оценка результата

Для подсчета выбирают чашки, посеянные из одного разведения, на которых выросло от 10 до 50 изолированных колоний. На них подсчитывают число колоний, отнесенных к общим колиформным бактериям, полученное число суммируют.

Если сделан посев 2-х 0,5 мл, то сумма колоний соответствует числу колиформ в разведении. Полученную сумму пересчитывают на объем 100 мл с учетом разведения.

Пример: При посеве из 5 разведения 2-х объемов по 0,5 мл на одной чашке получено 16, на другой - 20 колоний ОКБ. Тогда $16 + 20 = 36 : 10 \times 100 = 3,6 \times 10$ КОЕ/100 мл ОКБ.

Пример: При посеве 2-х объемов по 0,1 мл из 5-го разведения на одной чашке получено 22 колонии, на другой - 28 колоний. Тогда $22 + 28 = 50 : 2 \times 10 \times 100 = 2,5 \times 10$ КОЕ/100 мл ОКБ.

Допускается учет результата, но с отметкой в протоколе:

если на чашках выросло менее 10 или более 50 колоний;

если на одной чашке сливной рост, подсчет выполнен на другой чашке из этого разведения.

При подсчете результата ОКБ в обеззараженной воде суммируют все колонии ОКБ, выросшие на чашках или фильтрах, где получены изолированные колонии, и вычисляют результат по формуле:

$$X = (a \times 100) : V,$$

где X - число ОКБ в 100 мл;

a - число подсчитанных колоний ОКБ в сумме;

V - посеянный объем воды на чашки или фильтры, в которых велся подсчет колоний.

При этом объем, где нет роста колоний, также учитывают.

Метод определения термотолерантных колиформных бактерий

При необходимости получения информации о численности бактерий - показателей свежего фекального загрязнения можно продолжить анализ и подтвердить среди выросших темно - красных с металлическим блеском колоний число термотолерантных путем посева 10 - 14 колоний в прогретую до температуры 44⁰С среду с лактозой с последующей инкубацией при температуре 44 ± 0,5⁰С (по ISO 9308-1 1990 г. и МУК 4.2.671-97)

3.3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В СТОЧНЫХ ВОДАХ

Для обнаружения сальмонелл в сточных водах используют не менее двух сред накопления: магниевую, селенитовый бульон, Кауфмана, среду с охмеленным сушлом и др. Приготовление питательных сред по МУ 2285-81.

Схема посева сточной воды до очистки, после биологической очистки до обеззараживания: 100 мл засевают в равное количество среды накопления удвоенной концентрации, 10 мл сточной жидкости засевают в 100 мл среды нормальной концентрации, 1 мл стока вносят в 10 мл среды нормальной концентрации.

Схема посева сточной воды после обеззараживания: 500 мл стока вносят в магниевую среду экспедиционной прописи; 500 мл - в такое же количество одной из других сред накопления удвоенной концентрации.

Посевы инкубируют при температуре 37⁰С 18 - 20 часов. На следующий день при помутнении из сред накопления делают высев петлей на две чашки с висмут - сульфитным агаром с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Среды накопления выращивают в термостате до 48 часов, чашки с посевами инкубируют при температуре 37⁰С и просматривают через 18 - 24 часа.

При отсутствии роста на чашках через 24 часа их оставляют в термостате для последующего просмотра через 48 часов, а из сред накопления делают повторный высев на висмут - сульфитный агар.

На висмут - сульфитном агаре колонии сальмонелл - круглые черные с сероватым металлическим блеском вокруг них, зеленые с черным центром и без него, вызывающие потемнение среды под колонией. С каждой чашки снимают по 4 - 5 типичных для сальмонелл колоний на комбинированную среду, позволяющую устанавливать ферментацию глюкозы, лактозы, сахарозы, образование сероводорода, расщепление мочевины (среды Ресселя, Олькеницкого и др.).

При обнаружении на комбинированной среде типичной для сальмонелл реакции (ферментируют глюкозу, не расщепляют лактозу, сахарозу и мочевины, образуют сероводород) проводят серологическую идентификацию по определению серотипа по общепринятой методике.

3.4. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИФАГОВ В СТОЧНЫХ ВОДАХ

- Определение колифагов в сточной воде проводится методом прямого посева 3 объемов: до очистки - 0,1 мл, 1,0 мл и 10,0 мл; после очистки - по 10,0 мл из одной пробы с последующим учетом зон лизиса (бляшек) на газоне *E.coli* K12 F+ в чашках Петри с питательным агаром. Для контроля используют чашку с чистым газоном *E.coli* K12 F+ на питательном агаре.

- Проведение анализа.

За 24 часа до проведения анализа необходимо произвести посев детекторной культуры *E.coli* K12 F+ на косяк с питательным агаром. Перед проведением анализа сделать смыв бактерий 5 мл стерильной водопроводной воды и по стандарту мутности приготовить взвесь культуры *E.coli* в концентрации 10 бактериальных клеток в 1 мл.

Расплавить и остудить до 45⁰С 2-процентный питательный агар (Хоттингера, МПА, на гидролизате кильки). Объем пробы 50 мл предварительно обработать 5 мл хлороформа путем интенсивного встряхивания в течение 15 минут и затем поставить пробу для полного

осаждения хлороформа. Исследуемую воду внести в 3 стерильные чашки Петри по 10 мл в каждую. В остуженный питательный агар добавить смыв *E.coli* из расчета 1,0 мл смыва бактерий (в концентрации 10 бактериальных клеток в 1 мл) на 100 мл агара и осторожно перемешать. Полученной смесью по 15 мл залить сначала пустую чашку Петри (контроль газона *E.coli*), а затем все чашки, содержащие исследуемую воду. Содержимое чашек (10 мл пробы и 15 мл агара) осторожно перемешать легким покачиванием. Чашки оставить при комнатной температуре для застывания на 30 минут, затем перевернуть и дном вверх поместить в термостат на 18 часов при температуре +37°C.

- Учет результатов. Учет производят путем подсчета и суммирования бляшек, выросших на 3 чашках Петри в посеянном объеме с последующим пересчетом результата, выраженного в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл пробы воды. В контрольной чашке колифаги должны отсутствовать. При наличии бляшек в контрольной чашке результат не учитывается. Необходимо повторить анализ с новой культурой этого же штамма *E.coli* K12 F+, приготовленного из другой ампулы.

Глава 4. Контроль качества санитарно-микробиологических исследований воды

Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды описана в МУ 2.1.4.1057-01 «Методические указания. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. Методика». Данные методические указания предназначены для лабораторий, выполняющих санитарно-микробиологические исследования воды при обеспечении государственного санитарно-эпидемиологического и производственного контроля качества воды: питьевого, хозяйственно-бытового водоснабжения, водных объектов рекреации, спорта и др.

4.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Ведущим аспектом деятельности современной лаборатории является разработка Системы качества и обеспечение ее функционирования. Система качества - это совокупность организационной структуры, методик, процессов и ресурсов, необходимых для осуществления общего руководства качеством (ISO 8401:1994-04-01). Система качества охватывает широкий спектр позиций, начиная от нормативно-методической документации, всесторонне регламентирующей деятельность лаборатории, ее планировки и технического оснащения, квалификации, численности и расстановки кадров до организации внутреннего контроля качества выполняемых анализов.

Согласно МУ 2.1.4.682-97 по внедрению и применению СанПиН 2.1.4.559-96 внутри лабораторный (внутренний) контроль качества является обязательным звеном в обеспечении качества исследований воды. Внутренний контроль качества микробиологических исследований - это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур,

направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий развития искомого микроорганизма, а также предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата.

Особенностью санитарно-микробиологических исследований воды является необходимость количественной оценки полученного результата. Специфика объекта микробиологических исследований, живого микроорганизма, обладающего индивидуальными (родовыми, видовыми, штаммовыми) свойствами и особенностями жизнедеятельности в условиях водной среды, создает не зависящие от исследователя проблемы в оценке точности количественного результата и обуславливает погрешность микробиологических методов, достигающую сотен процентов.

К наиболее значимым объективным факторам, влияющим на результат анализа, относятся следующие:

- неравномерность распределения микроорганизмов, обуславливающая разброс данных при анализе двух одинаковых объемов одной пробы воды;

- способность адсорбироваться на взвешенных веществах с образованием трудноразделимых в процессе взбалтывания комплексов, которые при посевах могут регистрироваться как один микроорганизм;

- влияние сопутствующих микробов-антагонистов, тормозящих развитие искомого микроорганизма при их наличии в анализируемой пробе воды;

- возможное присутствие в исследуемой воде посторонних химических веществ либо образование их соединений с компонентами питательной среды, которые могут угнетать (стимулировать) рост исследуемых микроорганизмов, а также влиять на изменение видовых биохимических идентификационных признаков;

- нахождение микроорганизма в "стрессовом" состоянии под воздействием неблагоприятных условий водной среды, в результате которого затормаживается его способность к развитию.

Исходя из этого основной задачей микробиологических исследований является создание оптимальных условий для развития выделяемого микроорганизма в целях получения надежных, сопоставимых количественных результатов.

Организация внутреннего контроля качества на всех этапах выполнения микробиологического анализа воды является основой получения качественного результата.

Основные направления организации внутреннего контроля качества:

1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.).

2. Выполнение регламентированных процедур ведения тестовых культур.

3. Контроль качества питательных сред.

4. Контроль качества мембранных фильтров.

5. Контроль качества дистиллированной воды.

6. Оценка достоверности качественного результата путем использования заведомо положительных и отрицательных контролей.

7. Оценка доверительных границ полученного количественного результата.

8. Систематический анализ результатов контрольных процедур в целях совершенствования руководства по качеству.

4.2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОДГОТОВКЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Одним из факторов, оказывающих влияние на результаты проводимых исследований воды, является недостаточная чистота посуды.

Вся лабораторная посуда, вышедшая после проведения исследования (чашки, колбы, пробирки со средами), помещается в специальные биксы или ведра с крышками и обеззараживается автоклавированием при 126⁰С в течение

60 мин. или 132⁰С в течение 20 мин. Категорически запрещается освобождать использованную посуду от содержимого (питательных сред, растворов с посевами) до обеззараживания.

В исключительных случаях допускается обеззараживание кипячением в 2%-ном растворе пищевой соды или 0,5%-ном растворе нейтрального моющего средства в течение 60 мин. с момента закипания. Кипячение должно происходить в закрытой емкости с полным погружением в раствор.

Отработанные пипетки обеззараживают в высоком сосуде с полным погружением в дезраствор. Продолжительность обеззараживания зависит от применяемого дезсредства.

При выборе методов обеззараживания необходимо руководствоваться санитарными правилами СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами". Допускаются также к использованию новые дезинфекционные средства, получившие разрешение Минздрава России на применение. В этих случаях следует руководствоваться рекомендациями производителя.

Для мытья посуды необходимо применять нейтральные моющие средства, лучше всего применять жидкое моющее средство "Прогресс". Допустимо также использовать с этой целью нейтральные синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок (например, "Лотос", "Кристалл", "Эра").

Схема мытья посуды для исследования воды

Для облегчения процесса мытья посуды после автоклавирования обеззараженную посуду следует замочить в 1%-ном растворе моющего средства "Прогресс" в горячей воде на 1 - 2 часа. Всю посуду тщательно промыть с помощью ершей и щеток. Отполоснуть от моющего средства в проточной водопроводной воде (8 - 10 раз при использовании моющего средства "Прогресс" и до 15 раз при использовании других порошков).

Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3 - 4 раза. Высушить при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре 80 - 100⁰С.

Перед мытьем обеззараженных пипеток удаляют "ватки", промывают водопроводной водой под давлением и кипятят в 1%-ном растворе бикарбоната натрия в течение 45 мин., многократно промывают водопроводной, затем дистиллированной водой. Высушивают, вставляют "ватки" и стерилизуют в суховоздушном стерилизаторе в завернутом виде или пенале.

Обработка новой посуды

Новую посуду, предназначенную для бактериологических исследований, моют в 0,5%-ном растворе моющего средства, ополаскивают проточной водопроводной водой и кипятят в течение 15-20 мин. в 1-2%-ном растворе соляной кислоты, затем ополаскивают дистиллированной водой.

Проверка качества мытья лабораторной посуды

При обработке и мытье стеклянной лабораторной посуды используются моющие и дезинфицирующие средства, содержащие вещества, которые могут влиять на рост микроорганизмов. Контроль на наличие остаточных количеств моющих средств имеет важное значение.

Контроль чистоты мытья лабораторной посуды осуществляют путем визуального наблюдения и выборочного проведения тестов.

Стекло вымытой и высушенной посуды должно быть прозрачным, без подтеков, пятен и посторонних включений. При ополаскивании вымытой посуды вода стекает равномерно со стенок флаконов, пробирок, по поверхности чашек и пр.

Качество удаления синтетических моющих и моюще-дезинфицирующих средств оценивают по величине рН. Для этих целей используют рН-индикаторную бумагу с шагом измерительного диапазона не более 0,3 ед. Предварительно определяют рН воды, применяемой для ополаскивания

посуды на конечном этапе. Контрольные измерения рН проводят путем прикладывания рН-индикаторной бумаги к поверхности вымытого мокрого стекла, прошедшего обработку. Для контроля произвольно выбирают 3 – 10 ед. посуды. Значение рН воды, полученной в результате контроля, должно соответствовать рН дистиллированной воды, примененной для ополаскивания.

Наличие остаточных жировых загрязнений может быть определено с помощью реактива, содержащего Судан III. Для этого внутреннюю поверхность вымытой и высушенной посуды смачивают 3 - 5 мл красящего раствора, распределяют его по исследуемой поверхности в течение 10 с, затем быстро смывают обильной струей воды. На внутренней поверхности посуды не должно оставаться желтых пятен и подтеков.

Приготовление красящего раствора: в 70 мл нагретого до 60⁰С 90%-ного этилового спирта растворяют по 0,2 г измельченной краски Судан III и метилового синего, затем добавляют 10 мл 20 - 25%-ного раствора аммиака, 20 мл дистиллированной воды и взбалтывают. Раствор годен в течение 6 месяцев.

Подготовка посуды к использованию

Лабораторную посуду (флаконы, пробирки, бутылки, колбы) закрывают силиконовыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный (из фольги) колпачок. Бумажный колпачок обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым кольцом.

Чашки Петри, пипетки стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах.

При использовании специальной лабораторной посуды и расходных материалов (флаконов с завинчивающимися пробками, металлических или силиконовых колпачков, выдерживающих автоклавирование, микробиологических пробок многоразового использования и других материалов) следует руководствоваться рекомендациями производителя.

Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют сухим жаром в сушильном шкафу при 160⁰С - в течение 2 часов, 180⁰С - в течение 60 мин. или паром в автоклаве при 1 атм., 121⁰С - в течение 30 мин. С последующим подсушиванием в сушильном шкафу при отсутствии вакуумной сушилки в автоклаве.

После стерилизации посуду хранят до использования в закрытом шкафу или ящиках с крышками не более 10 суток при ненарушенной упаковке или не вскрытом пенале.

Пробирки и другую лабораторную посуду до стерилизации следует хранить в чистых коробках или ящиках столов, выложенных чистой фильтровальной бумагой. Сверху подготовленную посуду также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и случайной грязи.

Вымытые предметные стекла вытирают чистой салфеткой и помещают в склянку с притертой пробкой со смесью Никифорова (смесь этилового спирта и эфира в соотношении 1:1).

Обработка резиновых пробок

Новые пробки кипятят 30 мин. в 2%-ном растворе бикарбоната натрия, многократно промывают горячей проточной водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды). Затем пробки кипятят 30 мин. в дистиллированной воде, промывают и высушивают.

Пробки, бывшие в употреблении, после кипячения в 2%-ном растворе бикарбоната натрия ополаскивают проточной водопроводной водой, кипятят 30 мин. в дистиллированной воде, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают.

Резиновые пробки для флаконов заворачивают в бумагу или фольгу и стерилизуют автоклавированием.

Раздел составлен на основании:

СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами";

МУК 4.2.577-96 "Методы микробиологического контроля продуктов детского питания и лечебного, их компонентов";

Инструкции по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности, 1987;

ГОСТа 42-21-2-85 "Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы". МЗ, 1985;

Приказа МЗ РФ N 309 "Об утверждении Инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)";

XI Государственной фармакопей СССР. Вып. 2, 1990.

4.3. ПРАВИЛА ПРИГОТОВЛЕНИЯ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

Разведением для микробиологических исследований служит раствор или суспензия исследуемого образца, смешанные с девятикратным количеством жидкости для разведения - разбавителем.

Приготовление разведений необходимо:

- при исследовании загрязненных вод в целях снижения количества микроорганизмов на единицу объема, для обеспечения возможности наблюдения за их ростом или подсчетом колоний;

- для постановки исследований, требующих количественного учета используемых модельных микроорганизмов, например при количественной оценке качества питательных сред, мембранных фильтров и т.д.

Приемлемое для учета число микроорганизмов составляет:

- для метода подсчета колоний на чашках Петри (90 - 100 мм) - от 15 до 300;

- для учета колоний на фильтре (47 - 50 мм) - от 15 до 100 колоний;

- для учета колоний на фильтре (35 мм) - от 15 до 60 колоний.

Важным моментом в процедуре приготовления разведений является равномерность распределения внесенных микроорганизмов по объему разбавителя. Равномерность распределения достигается тщательным перемешиванием полученной смеси. Достичь более качественных результатов позволяет использование специальных приборов - встряхивателей.

В процессе приготовления разведений каждый образец с помощью прибора тщательно взбалтывают в течение 5 - 10 с. Частоту вращения подбирают так, чтобы жидкость, которая образует воронку, не доходила до края пробирки на 2 - 3 см.

Разбавители

В качестве разбавителей при приготовлении разведений используют:

Пептонно-солевой разбавитель:

Пептон	1,0 г
Натрий хлористый	8,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Физиологический раствор:

Натрий хлористый	8,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл.

Для приготовления разбавителя указанные компоненты растворяют в воде, при необходимости с подогреванием. Доводят рН так, чтобы после стерилизации он был равен 7,0 +/- 0,2 при 25⁰С. Разливают разбавитель во флаконы. Стерилизуют при 121⁰С в течение 20 мин. Помимо перечисленных выше разбавителей, для приготовления разведений исследуемой воды допускается применение стерильной водопроводной воды.

Методика выполнения разведений исследуемой воды

Разведения исследуемого образца воды следует готовить непосредственно перед анализом и использовать для инокуляции не позже 30

мин. с момента приготовления. В стерильные пробирки, количество которых соответствует выбранной степени разбавления исследуемой воды, асептически вносят по 9 мл разбавителя. В первую из пробирок, содержащих 9 мл разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, пипеткой вносят 1 мл хорошо перемешанной пробы воды, тщательно встряхивают или перемешивают пипетированием.

Приготовленное первое разведение (10) содержит в 1 мл суспензии 0,1 мл исходного образца. В следующую (вторую) пробирку, также содержащую 9 мл разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, новой пипеткой вносят 1 мл хорошо перемешанного первого разведения исследуемой пробы. Смесь тщательно встряхивают или перемешивают пипетированием. Второе разведение (10) в 1 мл суспензии содержит 0,01 мл исходного образца.

Процедуру приготовления разведений продолжают по описанной схеме до получения суспензии с необходимой концентрацией исходного образца (рис. 3).

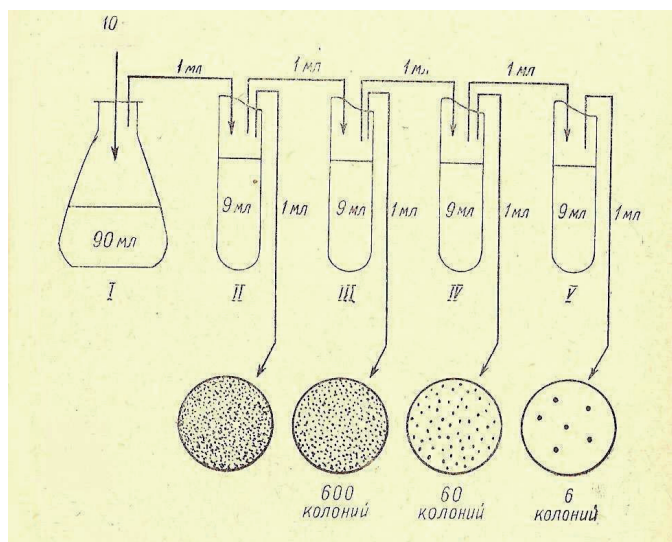


Рис. 12. Схема приготовления разведений.

Методика приготовления суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов

Приготовление суспензий с заданной концентрацией клеток тестовых микроорганизмов осуществляют с использованием оптического стандарта мутности, соответствующего 0,9 - 1 млрд. микробных клеток/мл.

В стерильную стандартную пробирку, прилагаемую к стандарту, вносят 3 - 4 мл разбавителя. Агаровую культуру тестового микроорганизма петлей переносят в пробирку и растирают по внутренней поверхности пробирки, постепенно смешивая с содержащимся в ней разбавителем.

Возможно приготовление бактериальной взвеси методом смыва выросшей культуры со скошенного агара 5 мл разбавителя.

Полученную взвесь микроорганизмов интенсивно встряхивают, добиваясь полного и равномерного распределения клеток. Мутность полученной взвеси сравнивают с мутностью оптического стандарта, который также предварительно тщательно встряхивают.

При визуальном несоответствии мутности приготовленной суспензии стандарту ее доводят либо добавлением агаровой культуры, либо добавлением разбавителя. После каждого вносимого изменения суспензию тщательно встряхивают.

При совпадении мутности приготовленной суспензии и мутности оптического стандарта считается, что концентрация клеток тестовой культуры в данной суспензии примерно соответствует значению, указанному для данного стандарта (0,9 - 1 x 10 кл/мл).

Для получения суспензии с нужной концентрацией тестового микроорганизма выполняют серийные разведения полученной стандартной суспензии описанным выше способом.

Для контроля правильности приготовления суспензии, правильности выполнения разведений и расчета заражающей дозы проводят контрольный высеv.

Раздел составлен на основе:

ISO 6887-1983 "Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований".

5. Приложения

5.1. Термины и определения.

- Бокс (боксованное помещение) - изолированное помещение с тамбуром (предбоксником).
- Бокс биологической безопасности (ламинарное укрытие, ламинарный шкаф) - конструкция, используемая для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды.
- Запас рабочей культуры - культура эталонного штамма в условиях временного хранения (полужидкий агар, 4 – 8⁰С).
- Запас эталонной культуры - культура эталонного штамма в условиях длительного хранения (-70⁰С, жидкий азот).
- Культура для целевого использования - культура эталонного штамма, прошедшая не более 2 пассажей после высева со среды временного хранения (из запасов рабочей культуры), предназначенная для использования в анализе.
- Лиофилизированная культура - лиофильно высушенная культура эталонного штамма.
- Патогенные биологические агенты (ПБА) - патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, хламидии, риккетсии, простейшие, грибы, микоплазмы), генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также материал, подозрительный на содержание перечисленных агентов (включая кровь, другие биологические жидкости и объекты окружающей среды).
- Коли-индекс, количественный показатель фекального загрязнения воды или пищевых продуктов. Определяется числом микробов — нормальных

обитателей кишечника человека (главным образом кишечной палочки — *Escherichia coli*) в 1 л или 1 кг субстрата. К.-и. — важный критерий санитарно-гигиенического контроля.

- Посевная - рабочее помещение, предназначенное для выполнения первого этапа санитарно-микробиологического исследования воды: концентрирования, разведения и/или посева в питательные среды.
- Посевная доза - объем конкретного разведения, содержащий необходимое для посева количество жизнеспособных клеток тестового микроорганизма.
- Разбавитель - жидкость определенного состава, служащая для приготовления серийных разведений исследуемой воды или модельных бактериальных культур.
- Субкультура - культура бактерий, полученная путем пассажа через полноценные питательные среды.

Рекомендуемая литература

1. Вода питьевая. Методы анализа. М.,1996 (Библиография и аннотация публикаций в изданиях ВИНТИ; предметный и формульный указатели).
2. Вода питьевая. Нормы. Стандарты. Качество. М.,1996 (Библиография и аннотация публикаций по нормам загряз. и стандартам качества в изданиях ВИНТИ; предметный и формульный указатели).
3. Вода питьевая. Обеззараживание. М., 1996 (Библ.публ. ВИНТИ)
4. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический словарь. Фомин Г.С.,М., 2000
5. Вода. Нефть. Жиры. Масла. Выделение и утилизация. Информационный сборник № 3. М.,1995 (Библ. и аннотации публикаций)
6. Вода. Проблемы малых населенных пунктов. Информационный сборник № 2. М.,1995 (Библиография и аннотация публикаций)
7. Вода. Тяжелые металлы. Выделение и утилизация. Информационный сборник № 4. М., ВИНТИ, 1996
8. Гигиеническая оценка материалов, реагентов, оборудования, технологий, используемых в системах водоснабжения. МУ 2.1.4.783-99. М., 1999
9. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения. СанПиН 2.1.7.573-96. М.,1997
10. Директива Совета Европейского Союза 98-83-ЕС по качеству воды, предназначенной для потребления человеком. ВНИИСтандарт, М.,1999
11. *Извлечения из словаря* "Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический словарь. Фомин Г.С.: М., 1995 (Общие требования к методам отбора проб воды. Методики контроля содержания неорганич. и органич. соединений)

- 12.Измерение массовой концентрации бенз(а)пирена в питьевой воде вольтамперометрическим методом. Методические рекомендации МР 146-1110. М., 1997
- 13.Методика выполнения измерений содержания сульфатов в сточных водах. Харьков,1990
- 14.Методика выполнения измерений содержания сухого остатка (растворенных веществ) в сточных водах. Харьков,1990 (Копия)
- 15.Методика выполнения измерений содержания фосфатов в сточных водах. Харьков,1990 (Копия)
- 16.Методика выполнения измерений содержания хлорид-ионов меркурометрическим методом в поверхностных и сточных водах. Харьков,1989
- 17.Методика выполнения измерения содержания железа III и железа общего фотометрическим методом с сульфосалициловой кислотой. Харьков,1989
- 18.Методика лабор. контроля качества измерений состава сточных вод. Харьков,1988
- 19.Методические указания по определению катионно-анионного состава грунтовых и поливных вод. М.,1995
- 20.Методические указания по определению концентраций химических веществ в воде хозяйственно-питьевого водоснабжения. (Сб. методических указаний. МУК 4.1.646-4.1.660-96.). М.,1997
- 21.Методические указания по определению хлоридов, нитратов и аммония в водах. М., 1996
- 22.Методические указания по определению цинка, меди, марганца и кобальта в природных водах. М.,1981
- 23.Обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. МУ 2.1.5.720-98. М., 1999
- 24.Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоемов и

- перспективных для промысла районов Мирового Океана. М., ВНИРО, 2003 (Современные химико-аналитические методы определения растворенного кислорода, фосфатов, нитратов, мочевины, аммония, кремния, суммарного железа, органических форм фосфора и азота; методы определения минеральных форм биогенных элементов на гидрохимических автоанализаторах.)
25. Определение массовой концентрации органич. соединений в воде методом хромато-масс-спектрометрии. МУК 4.1.663-97, М., 1997
26. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. СанПиН 2.1.4.1074-01. М., 2002
27. Санитарная оценка водных объектов при регистрационных испытаниях пестицидов, предназначенных к применению в сельском хозяйстве. МУ 2.1.5.693-98, М., 1998
28. Санитарно-паразитологические исследования воды. МУК 4.2.668-97, М., 1997 Санитарно – паразитологическое исследование воды хозяйственного и питьевого использования. МУК 4.2.964-00, М., 2000
29. Санитарно-эпидемиологический надзор за обеззараживанием сточных вод ультрафиолетовым излучением. МУ 2.1.5.732-99. М., 1999
30. Санитарные правила и нормы охраны поверхностных вод от загрязнений. М., 1988.
31. Санитарный надзор за применением ультрафиолетового излучения в технологии подготовки питьевой воды. МУ 2.1.4.719-98. Серия 2.1.4 “Питьевая вода и водоснабжение населенных мест”. М., 1998
32. Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников. СанПиН 2.1.4.1175-02. М., Минздрав, 2003
33. Химический анализ качества водных сред в центрах школьного экологического мониторинга. М., 1999 (Прописи приготовления

- реактивов для проведения контроля качества воды, атмосферных осадков, снежных выпадений)
34. Хромато-масс-спектрометрическое определение концентрации фенолов и хлорпроизводных в воде. МУК 4.1.667-97, М., 1997
 35. Определение концентраций химических веществ в воде централизованных систем питьевого водоснабжения. Сборник методических указаний. Выпуск 2. М., 1998 МУК 4.1.737-99-4.1.754-99.
 36. Определение концентраций химических веществ в воде централизованных систем питьевого водоснабжения. Сборник методических указаний. Вып. 3, М., МЗ, 2004, МУК 4.1.1205-4.1.1212-03
 37. Водоподготовка. Фрог Б.Н. Издание 2-ое переработанное. М., 2001 (Сведения по составу природных вод, способам оценки их качества, требования к качеству. Современные методы водоподготовки, технологич. схемы и водоочистные сооружения. Внимание уделено вопросам специальной обработки – удалению фенолов, нитратов, нитритов, фторированию, деманганации, обезжелезиванию, умягчению, опреснению, обессоливанию, удалению тяжелых металлов, ПАВ, пестицидов, гербицидов и др., очистке воды от радиоактивных веществ.)
 38. Экологические аспекты водопользования. Орлов В.Г., Трушевский В.Л., Научно-методическое пособие. С.-Пб., 1999
 39. Контроль качества и безопасности минеральных вод по химическим и микробиологическим показателям. Методические рекомендации №96/225, М., 1997
 40. Санитарная охрана водоемов от загрязнения сточными водами предприятий химической промышленности (методические рекомендации), Горький, 1990
 41. Методические рекомендации по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения, М., 1995. МР № ЦОС ПВ Р 005-95

42. Определение токсичности воды и водных экстрактов из объектов окружающей среды по интенсивности биолюминесценции бактерий (методические рекомендации), М., 1996. № 01-19/16-17
43. Указания по спектрофотометрическому способу экспрессной оценки качества очистки сточных вод от органических загрязнений, М., 1981
44. Методические указания по гигиенической оценке использования доочищенных городских сточных вод в промышленном водоснабжении, М., 1985. № 3224-85
45. Потери сырья и экологические нагрузки сточных вод мясокомбинатов. Методические указания. Степанов О.А., Кузнецова Г.Н., Кириков Л.А., М., 1994.
46. Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод. МУ 2.1.5.800-99
47. Определение концентраций химических веществ в воде централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения хемиллюминисцентными методами. МУК 4.1.965-4.1.968-00. М., 2000
48. Руководство по определению показателей качества воды полевыми методами. Муравьев Д.Г., С.-Пб., 1999 (Рассмотрены вопросы практической оценки показателей качества воды, имеющих нормативную основу, их особенности и экологическое, гидрохимическое и санитарно-химическое значение. Описаны правила отбора и подготовки проб, выбор оборудования, процедуры выполнения анализов унифицированными химико-аналитическими методами.)
49. Методические указания по экспрессному определению солевого состава водных вытяжек из почв, грунтовых и поливных вод методом ЦИНАО. М., 1991
50. Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть 1. Организация лаборатории. Методы санитарно-бактериологического и гельминтологического анализа сточных вод. М., 1982

51. Инструкция по эксплуатации очистных сооружений нефтебаз, наливных пунктов, перекачивающих и автозаправочных станций. Астрахань, 1988 (Описаны правила Эксплуатации очистных сооружений, требования к качеству очистки сточных вод, методы и схемы очистки, задачи персонала по эксплуатации канализационных сетей и объектов очистных сооружений, методы учета и контроля их работы, условия и устройства для выпуска сточных вод в водоемы; приведено методическое руководство по химическому анализу сточных вод.)
52. Очистка хозяйственно-бытовых сточных вод и обработка осадков. Афанасьева А.Ф., Сирота М.Н., Савельева Л.О., Эпов А.Н., М., 1997 (Источники образования, количественный состав хоз.-быт. сточных вод, методы очистки, внедрение новых технологий, методы обработки осадков сточных вод.)
53. Чистая вода. Системы очистки и бытовые фильтры. Миклашевский Н.В., С-Пб., 2000 (Сведения об основных свойствах воды, условиях формирования химического состава природных вод, источниках загрязнения, требования к качеству питьевой воды. Описаны технологии приготовления воды питьевого качества, различные способы очистки воды. Сведения о качестве воды в водных объектах, классификация водоемов по степени загрязнения, критерии загрязнения. Бытовые фильтры и их классификация.) Сельскохозяйственное использование сточных вод заводов минеральных удобрений и бесподстилочного навоза. Грисмес С. В., М., 1999 (Дана агромелиоративная и агроэкол. оценка сточных вод, обобщены результаты исследований по влиянию удобрений орошения сточными и навозными стоками на продуктивность и качество многолетних трав, плодородия почв. Установлены оптимальные дозы внесения сточных вод и навозных стоков.)
54. Химия и технология брома, иода и их соединений. Ксензенко В.М., Стасиневич Д.С., М., 1995 (Описаны са-ва брома и иода и наиболее важных неорганических и органических соединений, физикохимические

- основы технологии при переработке морской воды и концентратов, а также озерных и подземных минерализованных вод и твердых соляных отложений.)
55. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. СанПиН 2.1.5.980-00
56. Государственный контроль качества воды. 2-ое изд., перераб. и доп. М., ИПК Изд-во Стандартов, 2003 книга 727,00 (Включены межгосударственные и РФ стандарты: термины и определения, метрология, охрана источников водоснабжения и правила их выбора и контроля качества, отбор проб, контроль органолептических св-в, растворен, газов. Аннотированный перечень аттестованных методик по контролю загрязнения воды, перечень нормативных документов Минздрава)
57. Рекомендации по организации контроля качества вод в водопроводно-канализационных хозяйствах. Справочное пособие. С-Пб., Крисмас, 2000
58. Обработка осадков сточных вод. Туровский И.С., М, 1982 (копия); (Описаны состав и св-ва осадков, методы и установки для уплотнения, сгущения, стабилизации; обезвоживание, обеззараживание.)
59. Лабораторный практикум по водоотведению в очистке сточных вод, Калицун В.И. и др., М., Стройиздат, 2000 (Особое внимание - методам и приборам технологического контроля качества воды.)
60. Санитарно-микробиологический анализ питьевой, воды. МУК 4.2.1018-01 Минздрав, 2001 (Дата введения 1 июля 2001 г. впервые. Утратили силу МУК 4.2.671-97 "Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды и Информационно-методическое письмо Департамента. Госсан-эпиднадзора № 1100/1670-98-111 "О дополнительных мерах по осуществлению контроля качества питьевой воды по микробиологическим и паразитологическим показателям.)

- 61.РД 52.24.620-00. Методические указания. Охрана природы. Гидросфера. Организация и функционирование подсистемы мониторинга и антропогенного эвтрофирования пресноводных экосистем. Введены впервые. (Изложены положения организации и проведения специфических наблюдений за антропогенным эвтрофированием водоемов и водотрков.
- 62.Методы контроля. Химические факторы, Определение массовой концентраций нефтепродуктов в воде. МУК 4.1.1013-01. Минздрав, М., 2001
- 63.Техногенное загрязнение природных вод углеводородами и его экологические последствия М. 2001 (Проанализированы свойства нефтей и нефтепродуктов, определяющие их поведение в водных и геологических средах, источники их поступления в природные воды, горные породы, почвы. Дана оценка загрязнения подземных вод и почвогрунтов нефтепродуктами и возможности его локализации.)
- 64.Стратегия и методы восстановлений подземных трубопроводов. Орлов В., Харьков В., М., 2001 (Представлены сведения о современных методах бестраншейного восстановления трубопроводов и автоматизированная система поиска оптимального метода бестраншейного восстановления водоотводящей сети.)
- 65.Стратегия восстановления водопроводных и водоотводящих сетей. Учебное пособие. Орлов В.А., М., АСВ, 2001
- 66.Оптимизация восстановления водоотводящих сетей. Храменков С.В., Орлов В.А., Харьков В.А., М., Стройиздат, 2002 (Описаны семантические и математические модели, стратегии восстановления трубопроводов. Приведена классификация повреждений водоотводящих сетей. Представлены подходы к разработке стратегии восстановления напорных водоотводящих сетей и критерии поиска оптимальных методов бестраншейного ремонта безнапорных подземных трубопроводов)
- 67.Гигиенические требования к охране подземных вод от загрязнения. Санитарные правила. СП 2.1.5.1059-01, М., Минздрав, 2001

68. Водоотведение и очистка сточных вод. Яковлев С.В., Воронов Ю.В., М., АСВ, 2002 (Даны основные сведения о сис-мах отведения и составе, св-вах сточных вод, технологических схемах их очистки; сооружения по глубокой очистке и обеззараживанию сточных вод и утилизации их осадков. Рассмотрены различные с-мы водоотведения малонаселенных мест и отдельных объектов в особых природных и климатических условиях.)
69. Водоснабжение и водоотведение. Учебник. В.С. Кедров, В.Н. Исаев и др., М., Стройиздат, 2002 (Рассмотрены сис-мы, оборудование, установки, сооружения по водоснабжению и водоотведению зданий, объектов и населенных пунктов, включая сооружения для очистки воды, методы улучшения качества воды, а также сооружения для очистки сточных вод и методы их очистки. Нормативы расхода воды и стоков, санитарное оборудование и пр.)
70. Теоретические основы очистки природных и сточных вод. Учебное пособие. Вильсон Е.В., Ростов н/Д, 2002 (Излагаются основы физико-химических и биологических процессов очистки природных и сточных вод.)
71. Электродиализ природных и сточных вод. Вурдова Н.Г., Фомичев В.Т., М., АСВ, 2001 (Классификация и св-ва природных и сточных вод, основы электрокинетической и диффузной кинетики электродных процессов, необходимые для электрохимической очистки вод. Представлены конструкции аппаратов и методы расчетов, обоснована перспективность использования электродиализа для очистки природных и сточных вод и пр.)
72. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. Методические указания. МУ 2.1.4.1057-01. М., 2001
73. Питьевое водоснабжение из подземных источников. Проблемы и решения. Гуринович А.Д., Минск, 2001 (Предложены методология и

- принципы решения проблем организационного, технического, экономического и правового характера в системе: водоисточник-водозабор-водоподготовка-подача и распределение воды-локальная очистка-потребитель. Представлена методика выбора оптимальных схем и параметров скважинных водозаборов и пр.)
74. Водозаборы в системах централизованного водоснабжения. Порядин А.Ф. – М., НУМЦ Госкомэкологии. 1999 (Вопросы устройств и эксплуатации водозаборов в системах центрального водоснабжения. Дана оценка новой конструкции водоприемников, методов модернизации повышения надежности работы, совершенствования технологии отбора воды из поверхностных и подземных источников)
75. Определение ртути в природных водах. Лапердина Т.Г. Новосибирск, 2000 (Особое внимание уделено вопросам чувствительности и правильности определения ртути, а также отбору, фильтрованию, хранению водных проб, пробоподготовке и инструментальному определению.)
76. Медицинская микробиология, вирусологии и иммунология - Зверев В.В. - Учебник в 2-х томах + CD, 2010.
77. Матюхина З.П. Основы физиологии питания, микробиологии, гигиены и санитарии, учебник для нач. проф. образования — М.: Издательский центр «Академия», 2009.
78. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник для вузов (под ред. Воробьева А.А.), 2012. - 691 с.
79. Азаров В. Н. Основы микробиологии и санитарии: Учебник для учащихся техникумов, обуч. по спец. 1719 «Товароведение и организация торговли прод. товарами», 2010.
80. Санитарная микробиология. Автор: Р. Г. Госманов, А. Х. Волков, А. К. Галиуллин, А. И. Ибрагимов. Серия: Учебники для вузов. Специальная литература. Год выпуска: 2010.

81. Основы рационального водопользования и охраны водной среды. Семина В.А., М., Высшая школа, 2001
82. Санитарно-эпидемиологический надзор за использованием синтетических полиэлектролитов в практике питьевого водоснабжения. МУ 2.1.4.1060-01. М., Минздрав, 2001
83. ПДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Дополнение №3 к ГН 2.1.5.689-98. ГН 2.1.5.1093-02. ОДК химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Дополнение №3 к ГН 2.1.5.690-98. ГН 2.1.5.1094-02. М., Минздрав, 2002
84. Эколого-гидрогеологический словарь. Под ред. Воронова А.Н., С-Пб., 2001
85. Инженерная защита окружающей среды. Очистка вод. Утилизация отходов. Под ред. Бирмана Ю. А., Вурдовой Н. С. (для снижения экологического предложен эколого-инновационный проект самокупаемого предприятия по очистке сточных вод, производству тепличной продукции и утилизации отходов. Обоснованы инженерные мероприятия по улучшению экологического состава водных объектов.)
86. Использование метода измерения электрического сопротивления (импеданса) для санитарно-микробиологического исследования питьевой воды. МУК4.2.1111-02. Минздрав, М., 2002
87. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества. СанПиН 2. 1. 4. 1116-02, Минздрав, М., 2002
88. Методические указания по внедрению и применению СанПиН 2.1.4.1116-02. МУ 2.1.4.11-84-03, М., 2003
89. Гидроэкология на внутренних водных путях. Ботвинков В. М., Дегтярев В. В., Седых В. А., Новосибирск, Сибирское соглашение, 2002 (Общие вопросы гидроэкологии, исследования природных и антропогенных

воздействий на внутренние водные пути, инженерные методы предупреждения и ликвидации негативных экологических последствий. Особое внимание защите рек, водохранилищ, озёр, морей от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Оценка и снижение рисков, ликвидация последствий.)

90. Очистка воды от радиоактивных изотопов. Учебное пособие. Шевченко Е. Г., Новочеркасск, ЮРГТУ, 2000 (Рассмотрены научные основы очистки воды от естественных и искусственных радиоактивных загрязнений (коагуляция, химическое осаждение, ионный обмен, электродиализ, дистилляция, флотация, коагуляция, сорбция, биологические методы)
91. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М., РЭФИА, НИА-Природа, 2002
92. Водоснабжение и водоотведение в сельском хозяйстве. В.М. Усаковский, М., Колос, 2002 (Показана специфика водоснабжения и водоотведения с/х поселков и животновод, ферм, взаимосвязь добывания, обработки и комплексного использования воды и стоков. Даны рекомендации по выбору оптимальных типов водозаборных сооружений, насосов, энергетических агрегатов и водоводов.)
93. Вода, которую мы пьем. М.ахманов. Качество питьевой воды и ее очистка с помощью бытовых фильтров. С-Пб., 2002
94. Методические рекомендации по контролю водных объектов. Государственный ин-т прикладной экологии.
95. Вода. Индикаторные системы. Островская В.М., Запорожец О.А., Будников Г.К., Чернавская Н.М., М., 2002 (Рассмотрены основные индикаторные средства химического и биологического характера для контроля загрязнения воды, перспективные экспрессные методы анализа с использованием высокочувствительных тестовых средств и их методы получения.)

96. Гидрохимия. Никаноров А.М., С-Пб., Гидрометеоздат, 2001
(Теоретические основы, вопросы общей и прикладной гидрохимии. Строение и св-ва воды, химический состав природных вод; особенности хим. состава атмосферных осадков, речных, озерных, подземных вод, их классификация. Методы хим. анализа, методы расчета баланса хим. в-в водных объектов и пр.)
97. Методика исчисления размера ущерба от загрязнения подземных вод. Утв. Министерством экологии 11.02.98
98. Каталог водоочистного оборудования. Методическое пособие. С-Пб., Центр обеспечения экологического контроля, 2002
99. Геоэкологические проблемы подземных и наземных накопителей жидких отходов в солянокупольных областях. Синяков В.Н., Старовойтов М.К., Полянинов Л.Я. и др., М., НИИ-Природа, 2001
100. Наладка и эксплуатация систем водоснабжения. Турянский И.П., Бутко А.В. и др. Учебное пособие. Ростов-на-Дону, 2002
101. Оценка экологического состояния водоемов методами ихтиоиндикации. Попов П.А., Новосибирск, 2002



MoreBooks!
publishing



yes i want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

