

Утверждаю
Начальник Главного
санитарно-эпидемиологического
управления Министерства
здравоохранения СССР
В.Е.КОВШИЛО
19 января 1981 г. N 2285-81

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ
ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ**

Разработаны:

Министерством здравоохранения СССР, Институтом общей и коммунальной гигиены им. А.Н. Сысина
АМН СССР

при участии:

Московского научно-исследовательского института им. Ф.Ф. Эрисмана, Киевского института общей и коммунальной гигиены им. А.Н. Марзеева, Куйбышевского института гигиены, городской санэпидстанции г. Москвы.

Рассмотрены и рекомендованы к утверждению Лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Министерства здравоохранения СССР.

Настоящие Методические указания распространяются на воду водоемов, используемых или намечаемых к использованию в качестве источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения или для рекреационных целей, и устанавливают методы санитарно-микробиологического анализа воды.

Методические указания являются обязательными при исследовании качества воды поверхностных водных объектов в соответствии с ГОСТ 17.1.3.03-77 "Охрана природы. Гидросфера. Правила выбора и оценка качества воды источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения" и ГОСТ 17.1.5.02-80 "Охрана природы. Гидросфера. Гигиенические требования к зонам рекреации водных объектов".

Санитарно-микробиологический анализ воды подземных источников производят в соответствии с ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа".

При выборе нового поверхностного источника централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения или места рекреации санитарно-микробиологический анализ осуществляется учреждениями санэпидслужбы, а также другими организациями, которым санэпидслужба предоставляет право проведения санитарно-микробиологических анализов, по показателям, установленным ГОСТ 17.1.3.03-77: основной показатель - лактозоположительные кишечные палочки, дополнительные показатели - сапрофитные микроорганизмы, *E. coli*, энтерококки, фаги кишечных палочек, сальмонеллы, шигеллы, кишечные вирусы.

При лабораторно-производственном контроле качества воды эксплуатируемых источников водоснабжения санитарно-микробиологический анализ осуществляется производственными лабораториями и может быть ограничен определением двух показателей: числа сапрофитных микроорганизмов (температура инкубации 37 град. С) и лактозоположительных кишечных палочек.

При текущем контроле качества воды в местах рекреации санитарно-микробиологический анализ ограничивается определением числа лактозоположительных кишечных палочек.

На водном объекте, эксплуатируемом в качестве источника водоснабжения или для рекреации, в случаях превышения установленных в соответствующих ГОСТ нормативов по коли-индексу для решения вопроса о проведении гигиенических и других мероприятий проводят дополнительные исследования:

- при неблагоприятной санитарной и эпидемической ситуации определяют патогенные микроорганизмы (сальмонеллы, шигеллы, кишечные вирусы, а в местах массового купания также и стафилококки);
- при необходимости уточнить источник и характер микробного загрязнения определяют *E. coli*, энтерококки, фаги кишечных палочек.

Дополнительные исследования воды осуществляются органами санитарно-эпидемиологической службы.

1. Отбор, хранение и транспортирование проб воды

1.1. Отбор пробы воды осуществляется санитарным врачом, его помощником или специально инструктированным по методике отбора проб лицом под его личную ответственность.

1.2. Поверхностные пробы отбирают с глубины 10 - 15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. В случаях необходимости отбора проб на разных глубинах придонные пробы отбирают в 30 - 50 см от дна. В местах купания отбирают поверхностный слой воды, не заглубляя горлышко бутылки. Отбор проб следует производить с использованием различных плавсредств, с мостов, помостов и т.п., в местах, где глубина водоема не менее 0,5 м. Недопустимо производить отбор проб с берега.

1.3. Пробу воды отбирают с соблюдением правил стерильности: в стерильную посуду, стерильными батометрами, руки перед отбором проб должны быть обеззаражены. При отборе одним батометром нескольких проб его каждый раз стерилизуют фламбированием. Из одной точки в первую очередь отбирают пробы для микробиологических исследований, а затем для других целей. Проруби делают избегая внесения загрязнения со льда и инструментов. Посуду открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и горлышко не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду не следует.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность (корковой, резиновой, ватной, обернутой фольгой, и т.п.), и стерильным колпачком.

1.4. Объем пробы зависит от того, какие микроорганизмы должны быть определены:

- при анализе воды на индикаторные микроорганизмы - 500 мл;
- при анализе воды на индикаторные и патогенные бактерии (сальмонеллы, шигеллы) - 2500 мл;
- при анализе воды на индикаторные, патогенные бактерии и кишечные вирусы - 3500 мл.

2. Аппаратура, лабораторная посуда, реактивы, питательные среды

2.1. Аппаратура, лабораторная посуда, материалы и реактивы по ГОСТ 18963-73.

2.2. Реактивы для дополнительных методов исследования.

Агар-агар в волокнах или в порошке по ГОСТ 17206-71.

Агар с эозинным метиленовым синим сухой ТУ 42.14.95-77.

Антибиотики: левомицетин (хлорамфеникол),

полимиксин М,

синтомицин,

фурациллин.

Висмут-сульфит агар сухой ТУ 42.14.127-78.

N,N'-диметил-пара-фенилендиамин солянокислый и другие фенилендиаминовые соединения ТУ 6-09-1828-72.

Желчь сгущенная и сухая для технических целей ОСТ 19-11-70.

Желчь крупного рогатого скота свежая или сухая обезвоженная.

Индикаторы: бриллиантовый зеленый ТУ 6-09-4278-76.

Калий теллуристокислый ТУ 6-09-2060-77.

Кислота ортофосфорная ТУ 6-09-4229-76.

Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209-77.

Метиленовый синий.

Молоко.

Натрия азид.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156-76.

Натрий кислый селенистокислый ТУ 6-09-1965-77.

Натрий углекислый по ГОСТ 4332-76.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172-76.

Натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245-76.

Альфа-нафтол по ГОСТ 5838-79.

Перекись водорода по ГОСТ 10929-76.

Пара-диметиламинобензальдегид ТУ 6-09-3272-77.

Сусло охмеленное.

Сыворотки агглютинирующие адсорбированные поливалентные сальмонеллезные О-сыворотки группы АВСДЕ (сухие) и редких групп.

Сыворотки О и Н сальмонеллезные агглютинирующие адсорбированные (сухие).

Сыворотки агглютинирующие адсорбированные поливалентные к шигеллам.

2, -3, -5-трифенилтетразолий хлорид ТУ 6-09-3838-78.

Ферментативный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления ТУ 42.14.528-73.

Яйца куриные.

Примечание. Допустимая погрешность взвешивания 0,1%.

2.3. Подготовку посуды и материалов и их стерилизацию осуществляют в соответствии с ГОСТ 18963-73.

2.4. Приготовление питательных сред и реактивов.

2.4.1. Приготовление фуксин-сульфитной среды Эндо (в модификации Т.З. Артемовой).

Готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. В готовую и охлажденную до 60 - 70 град. С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды: 0,2 мл 10% спиртового раствора основного фуксина для повышения дифференцирующих свойств среды. Добавление розоловой кислоты, рекомендуемое ГОСТ 18963-73, не обязательно.

Если на поверхности среды заметные следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить. Срок хранения чашек со средой не более 2 - 3-х суток в темноте, раствора фуксина - не более 1-го месяца.

При исследовании методом мембранных фильтров воды чистой и средней степени загрязнения, где значительно преобладает над бактериями группы кишечных палочек водная микрофлора, вырастающая на среде Эндо, для частичного подавления роста посторонних бактерий на 100 мл среды Эндо допускается (помимо фуксина) добавление 0,4 - 0,5 мл 5-процентного водного раствора фенола и 1,8 мл этилового спирта.

2.4.2. Приготовление полужидкой среды с лактозой.

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 4 - 5 г агар-агара, доводят до кипения, устанавливают рН (7,2 - 7,4), добавляют 1 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего. Стерилизуют при 120 +/- 2 град. С (1,1 кгс/кв. см) 20 мин. В расплавленную среду вносят 5 г лактозы, нагревают до кипения, разливают в стерильные пробирки столбиком высотой 3 см и стерилизуют при 112 град. С (0,5 кгс/кв. см) 12 мин. Срок хранения не более 2-х недель.

2.4.3. Приготовление полужидкой среды с лактозой из сухого препарата с ВР - по прописи на этикетке. Срок хранения не более 7 суток.

2.4.4. Приготовление лактозо-пептонной среды.

10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 5 г лактозы растворяют при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды. После растворения устанавливают рН (7,4 - 7,6), разливают по 10 мл в пробирки с поплавками или комочками ваты, стерилизуют в автоклаве при 112 град. С 12 мин. Для наглядности можно добавить индикатор по ГОСТ 18963-73.

Концентрированную лактозо-пептонную среду готовят так же, как и среду нормальной концентрации, но с добавлением на 1000 мл дистиллированной воды 39 г пептона, 19,3 г натрия хлористого, 19,3 г лактозы. Разливают по 3 мл в пробирки или по 15 мл во флаконы с поплавками.

2.4.5. Приготовление желчно-лактозного бульона с бриллиантовым зеленым по ГОСТ 18963-73.

При использовании среды для одновременного определения ферментации лактозы и образования индола следует уменьшить количество лактозы до 1 г и добавить 1 г триптофана (среда ФКП-1 Г.П. Калины). При отсутствии триптофана следует вместо воды использовать бульон Хоттингера, содержащий аминного азота 100 - 120 мг.

2.4.6. Приготовление лактозного бульона с борной кислотой по ГОСТ 18963-73.

Примечание. От точности взвешивания ингибитора - борной кислоты - зависит качество среды. Каждую новую партию борной кислоты следует испытать: при выращивании E. coli при температуре 43 град. С среда дает положительную реакцию (газ), при выращивании Enterobacter - отрицательную.

2.4.7. Приготовление реактива для определения оксидазного теста.

Готовят: 1. 1-процентный спиртовой раствор альфа-нафтола;

2. 1-процентный водный раствор любого фенилендиаминового соединения (диметил-п-фенилендиамина, диметил-п-фенилендиамина солянокислого, дифенил-п-фенилендиамина).

Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: 1-й - до одного месяца, 2-й - до одной недели. Перед употреблением к трем частям первого раствора добавляют семь частей второго раствора. Реактив может быть заменен готовой бумажной индикаторной системой, которую перед определением следует смочить дистиллированной водой.

Каждую новую партию реактива, а также периодически в процессе его хранения, следует проверять на заведомо положительных культурах, а при их отсутствии - при посеве воды водоемов, где обязательно бывает оксидазоположительная микрофлора.

2.4.8. Приготовление щелочно-полимиксиновой среды (ЩЭС) (Г.П. Калина).

	Обычная концентрация	Удвоенная концентрация
1. Мясо-пептонный бульон Натрий хлористый Глюкоза Дрожжевой экстракт	70,0 мл 0,5 г 1,0 г 2,0 мл (или 2 г)	70,0 мл 1,0 г 2,0 г 4,0 мл (или 4 г)
2. Вода дистиллированная Натрий углекислый	15,0 мл 0,53 г	15,0 мл 1,1 г
3. Вода дистиллированная Натрий двууглекислый	10,0 мл 0,25 г	10,0 мл 0,5 г

Раздельная стерилизация растворов 1, 2 и 3 при 112 град. С 12 мин. После стерилизации растворы смешивают, проверяют рН (10,0 - 10,2), прибавляют 20000 единиц полимиксина М, 0,5 мл 1,6-процентного спиртового раствора бромтимолового синего, разливают в пробирки по 5 мл. В среду удвоенной концентрации добавляют 40000 единиц полимиксина М и 1 мл бромтимолового синего. Разливают в колбы или флаконы по 10, 50 или 100 мл соответственно количеству исследуемой воды.

2.4.9. Приготовление молочно-ингибиторной среды (Г.П. Калина).

Готового питательного агара 85 мл, стерильного снятого молока 15 мл, 0,1-процентного водного раствора кристаллического фиолетового 1,25 мл, теллурита калия 2-процентного водного раствора 1 мл. Все хорошо смешать и разлить в чашки.

2.4.10. Приготовление дрожжевого экстракта (Г.Г. Калина).

1000 г прессованных (пекарских) дрожжей распределяют равномерно в 2000 мл дистиллированной воды, прогревают в автоклаве при 100 град. С 30 мин., отстаивают в холодильнике 4 - 5 суток. Декантируют надосадочную жидкость, разливают во флаконы по 50 - 100 мл, прибавляют на каждые 100 мл экстракта 1,25 мл 0,01-процентного водного раствора кристаллического фиолетового, вновь прогревают при 100 град. С 30 мин. Хранят экстракт в холодильнике. Экстракт можно готовить по этой же методике из 1000 г сухих дрожжей на 6000 мл дистиллированной воды. Можно применять сухой дрожжевой экстракт фабричного производства, уменьшив концентрацию в 10 раз.

2.4.11. Приготовление азидной среды Сланца в модификации Т.З. Артемовой.

30 - 40 г сухого питательного агара, 4 г калия фосфорнокислого однозамещенного расплавляют при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды, устанавливают рН 7,0, разливают мерно в сосуды, стерилизуют при 120 град. С 20 мин. Перед употреблением в расплавленный и слегка остуженный агар добавляют из расчета на 100 мл среды: дрожжевого экстракта - 2 мл, глюкозы - 1,0 г, азида натрия - 0,04 г, 1-процентного водного раствора 2, -3, -5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) - 1 мл. Тщательно смешивают, разливают в чашки по 20 - 25 мл. Хранят в холодильнике не более 2-х недель. Среду можно готовить перед употреблением без стерилизации в автоклаве.

2.4.12. Приготовление желчной среды "ЖСТ" (И.Н. Турчинский).

К 600 мл дистиллированной воды добавляют 400 мл желчи крупного рогатого скота, 35 - 40 г сухого питательного агара, 5 г однозамещенного фосфата калия, 5 г двухзамещенного фосфата калия, 5 г натрий-аммоний фосфата, расплавляют при нагревании, устанавливают рН 7,2 - 7,4, разливают мерно во флаконы и стерилизуют при 120 град. С 20 мин. Перед употреблением в расплавленный и слегка остуженный агар добавляют из расчета на 100 мл среды: 0,5 г глюкозы, 1 мл 1-процентного водного раствора ТТХ, 0,6 мл 1-процентного водного раствора метиленового синего (хранить не более 14 дней), 30000 ЕД полимиксина М, 1 - 2 мл 0, 1-процентного спиртового раствора фурациллина. Тщательно смешивают, разливают в чашки по 20 - 25 мл. Хранят в холодильнике не более 7 суток.

2.4.13. Приготовление молочно-желточно-солевого агара (МЖСА) (Е.Д. Вовк, В.Н. Ульянова, в модификации Т.З. Артемовой).

Сухой питательный агар по прописи на этикетке и 90 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды, разливают мерно в сосуды, стерилизуют при 120 град. С 20 мин. Перед употреблением в расплавленный и остуженный до 50 - 55 град. С солевой агар добавляют:

- стерильное обезжиренное молоко - 60 мл;
- один яичный желток, тщательно смешанный с 50 мл физиологического раствора с помощью стеклянных бус;

- полимиксин М (раствор хранят не более 14 дней) 300000 ЕД (при наличии постороннего роста).

Тщательно смешивают и разливают в чашки Петри толстым слоем по 20 - 25 мл для выращивания бактерий на мембранных фильтрах и тонким слоем по 12 - 15 мл для подтверждающего этапа.

Молочно-желточный агар готовят по этой же прописи, но без добавления натрия хлористого.

2.4.14. Приготовление индикаторных бумажек для определения продукции индола.

4 г пара-диметиламинобензальдегида растворяют в 50 мл этилового спирта 96 град., добавляют 10 мл ортофосфорной кислоты (очищенной концентрированной). Реактивом смачивают полоски из фильтровальной бумаги на 1/3 их длины. Смоченный конец - лимонно-желтый. Высушенные индикаторные бумажки можно сохранять в темноте длительное время. Чувствительность бумажек возрастает при замене этилового спирта на амиловый или изоамиловый.

2.4.15. Приготовление тетраэтилового тетрааммонийного сульфата среды Мюллера-Кауфмана (экспедиционная модификация Г.П. Калины).

В 500 мл исследуемой воды вносят 25 мл 10-процентного пептона, 0,5 г желчных солей, 5 г кальция углекислого, 15 г натрия тиосульфата, 5 мл 0,1-процентного водного раствора бриллиантового зеленого, 10 мл раствора Люголя. Для приготовления раствора Люголя в 10 мл воды вносят 3 г йода кристаллического и 2,5 г калия йодистого.

2.4.16. Приготовление желчной соли по Олькеницкому.

К 1000 мл желчи прибавляют 40 г натрия гидрата окиси, гидролизуют в автоклаве при 120 град. С 3 часа или 2 раза по 2 часа. Нельзя производить гидролиз в алюминиевой посуде. После охлаждения в гидролизат прибавляют 100 мл 20-процентного водного раствора бария хлористого и прогревают в автоклаве при 100 град. С 1 час. Через 18 - 24 часа сливают жидкость с осадка и фильтруют. К профильтрованному гидролизату прибавляют при постоянном помешивании 20-процентный раствор соляной кислоты до кислой реакции (рН 6,4 - 6,6) и оставляют на 18 - 24 часа. Надосадочную жидкость сливают, осадок промывают водой, прибавляют при нагревании 40-процентный раствор натрия гидрата окиси до слабощелочной реакции (рН 7,2 - 7,4) и выливают на противень для подсушивания в сушильном шкафу при 115 град. С до порошкообразного состояния. Из 1000 мл желчи можно получить 36 г смеси желчных солей. Следует остерегаться сильного перещелачивания при последней операции. Хранят соли в темной банке с притертой пробкой.

2.4.17. Приготовление селенитового бульона (Лейфсон).

2.4.17.1. Приготовление основного раствора (буфера).

В стерильную колбу наливают 1 л дистиллированной воды, добавляют 10 г пептона (импортного, стран - членов СЭВ) или ферментативный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления, растворяют нагреванием, добавляют 6 г натрия фосфорнокислого однозамещенного безводного, 14 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, 8 г лактозы. Тщательно перемешивают, фильтруют, стерилизуют при 112 град. С 12 мин. Основной раствор хранят 1 - 2 месяца при +4 град. - +10 град. С.

2.4.17.2. Приготовление 10-процентного раствора натрия кислого селенистокислого.

В 100 мл дистиллированной воды растворяют 10 г натрия кислого селенистокислого. Раствор готовят ex tempore.

2.4.18. Приготовление магниевой среды (рецептура приготовления 100 мл среды обычной и двойной концентрации) (Раппопорт, Конфорти, Навои, в модификации Г.П. Калины и В.Л. Шигановой).

Готовят отдельно растворы А, Б, В по нижеследующей прописи:

Раствор	Ингредиенты	Обычная концентрация	Удвоенная концентрация
А	Пептон семипалатинский	0,42 г	0,84 г
	Натрий хлористый	0,7 г	1,4 г
	Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,15 г	0,3 г
	Дрожжевой экстракт	2,0 мл	4,0 мл
	Вода дистиллированная	89,0 мл	89,0 мл
Б	Магний хлористый кристаллический	3,6 г	7,2 г
	Вода дистиллированная	9,0 мл	9,0 мл
В	Бриллиантового зеленого 0,1-процентный водный раствор	0,5 мл	1,0 мл

Ингредиенты растворяют, кипятят в течение 10 мин., затем растворы А, Б и В сливают в одну колбу.

Для облегчения транспортирования и хранения можно предварительно готовить навески и растворы ингредиентов среды в расфасованном виде, которые затем вносят в исследуемый субстрат в соответствии с нижеследующей схемой (Г.Г. Калина):

Навески ингредиентов на исследуемые объемы жидкостей	500 мл	100 мл
Магний хлористый кристаллический	19,5 г	3,9 г
Натрий хлористый	4,0 г	0,8 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный безводный	0,8 г	0,16 г
10-процентный раствор пептона	25,0 мл	5,0 мл
Дрожжевой экстракт	11,0 мл	2,5 мл
Бриллиантового зеленого 0,1-процентный водный раствор	2,5 мл	0,5 мл

Все навески можно соединить в одной емкости в виде жидкой кашицы. Уже через 24 часа хранения при комнатной температуре происходит самостерилизация концентрата, который вносят в исследуемую воду без дополнительной стерилизации.

2.4.19. Приготовление среды с охмеленным суслom (при отсутствии необходимости количественного определения сальмонелл и для определения шигелл) (С. Данон-Моше, Ю.Г. Талаева).

125 мл охмеленного сусла наливают в стерильную посуду, добавляют 6,3 г пептона, размешивают, доводят до кипения и кипятят на медленном огне в течение 5 мин. Остужают, приливают 500 мл исследуемой воды, 15 капель 20-процентного раствора натрия гидрата окиси, доводя рН до 7,8, добавляют 8,7 мл 0,1-процентного раствора бриллиантового зеленого. Среда готовится *ex tempore*.

2.4.19.1. Приготовление среды с охмеленным суслom для количественного определения сальмонелл (методика ИОКГ им. А.Н. Сысина). 140 мл охмеленного сусла наливают в колбу, добавляют 7 г пептона, размешивают, доводят до кипения, кипятят на медленном огне в течение 5 мин., остужают, добавляют 17 капель 20-процентного раствора натрия гидрата окиси, доводя рН среды до 7,8, и 9,7 мл 0,1-процентного раствора бриллиантового зеленого. Расчет среды с охмеленным суслom приведен на 1 ряд разведений.

2.4.20. Приготовление агара с эозиновым метиленовым синим (ЭМС) и бактоагара Плоскирева с антибиотиками.

На 1 л свежеприготовленной среды до застывания добавляют 8 мл 0,5-процентного раствора синтомицина или 4 мл 0,5-процентного раствора левомицетина. После этого среду разливают в чашки.

2.4.21. Приготовление желчного бульона.

К мясо-пептонному бульону добавляют нативную желчь крупного рогатого скота, устанавливают рН 7,6. Для получения 10-процентного желчного бульона к 900 мл мясо-пептонного бульона добавляют 100 мл желчи. Приготовленный желчный бульон стерилизуют в автоклаве при 120 град. С 20 - 30 мин.

3. Определение числа сапрофитных микроорганизмов

К сапрофитным микроорганизмам относят мезофильных, сапротрофных аэробов и факультативных анаэробов, способных образовывать на питательном агаре данного состава колонии, видимые при увеличении в 2 раза.

При выборе нового источника водоснабжения целесообразно определять:

- число сапрофитных микроорганизмов, вырастающих при температуре 20 - 22 град. С в течение 48 часов;
- число сапрофитных микроорганизмов, вырастающих при температуре 37 град. С в течение 24 часов.

Соотношение численности этих групп микроорганизмов позволит судить о динамике и интенсивности процесса самоочищения. При температуре 20 град. С вырастает больше сапрофитных микроорганизмов, чем при температуре 37 град. С. Эта разница более выражена при завершении процесса самоочищения. В местах загрязнения хозяйственно-бытовыми сточными водами численные значения обеих групп близки. Сапрофиты, вырастающие при температуре 20 град. С, являются активными участниками процесса самоочищения водоемов.

При лабораторно-производственном контроле за действующими источниками водоснабжения определяют только одну группу при температуре 37 град. С. Динамика численности этого показателя является чувствительным индикатором загрязнения водоема, в частности органическими веществами.

3.1. Объем исследуемой воды.

Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы не менее чем на 2-х чашках выросло от 20 до 300 колоний. Из каждой пробы должно быть посеяно не менее 2-х десятикратных разбавлений в 2-х повторностях. При выборе разбавлений ориентируются на результаты предыдущих анализов и на указания таблицы Приложения 1.

При исследовании заведомо чистых вод с содержанием сапрофитов до 300 в 1 мл делают посев пробы воды без разбавления по 1 мл в 2-х повторностях. При исследовании воды неизвестной степени микробного загрязнения производят посев 4-х десятикратных разбавлений.

3.2. Выполнение анализа.

После тщательного перемешивания пробы готовят разбавления и немедленно вносят по 1 мл воды из пробы или из соответствующего разбавления в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки. Сразу же после внесения воды в каждую чашку вливают 5 - 7 мл (на чашку диаметром 95 мм) расплавленного и остуженного до 45 - 46 град. С питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержался. 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.

Не допускается посев из разбавлений, приготовленных заранее. Целесообразно сохранять расплавленный агар во время посевов в водяной бане, автоматически поддерживающей температуру 45 - 46 град. С. Тонкий слой агара увеличивает эффективность учета сапрофитной микрофлоры водоемов за счет лучших условий для роста аэробных бактерий, преобладающих в водоемах. Колонии вырастают более крупные, легко подсчитываемые на фоне прозрачного тонкого слоя агара. Ограничен рост расплывчатых колоний.

3.3. Выращивание посевов.

Чашки с посевами в одной повторности помещают в термостат и выращивают при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 24 +/- 2 часа. Посевы в другой повторности выращивают при температуре 20 - 22 град. С в течение 48 +/- 2 часов.

3.4. Учет результатов.

Должны быть подсчитаны все выросшие на чашке колонии, видимые при увеличении в 2 раза. Подсчет следует производить только на тех чашках, на которых выросли изолированные колонии в количестве от 20 до 300. При посеве 1 мл неразбавленной пробы ведут подсчет на чашках с любым количеством колоний, меньшим 300.

Подсчитанное число колоний на каждой чашке делят на объем воды в мл, засеянный на те чашки, на которых велся подсчет, и вычисляют среднее арифметическое. Результат выражают в числе колоний в 1 мл исследуемой воды, округляя до 2 - 3-х значимых чисел.

Допустимы следующие исключения из общего правила, но с отметкой в протоколе анализа.

Результат можно представить на основании подсчета колоний на одной чашке, если на других чашках: а) рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки; б) число колоний превышает 300 - 500; в) при посеве из разбавлений выросло менее 20 колоний.

Если на всех чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространившийся на всю поверхность чашки, или в результате неудачной схемы посева в чашках с посевом самого большого разбавления выросло

более 300 колоний и анализ нельзя повторить, допустимо в порядке исключения вести подсчет с помощью счетной пластинки, разделенной на квадраты, или трафарета, делящего чашку на сектора. Подсчитывают не менее 1/4 площади чашки в разных местах, с последующим пересчетом на всю площадь чашки.

Если рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки и подсчет невозможен, то в протоколе анализа отмечают "сплошной ползучий рост".

Окончательный результат заносят в протокол анализа, где обязательно указывают температуру инкубации посевов. Кроме того, в примечании отмечают особые обстоятельства, могущие повлиять на результат (превышение срока хранения пробы, изменение температуры и времени инкубации посевов, отклонения от правила при учете результатов и т.п.).

Воспроизводимость результатов метода может быть достигнута при строгом соблюдении деталей техники анализа, а также при использовании питательного агара одинакового состава.

4. Определение числа лактозоположительных кишечных палочек

В качестве основного показателя степени фекального загрязнения воды водоемов определяют лактозоположительные кишечные палочки (ЛКП), к которым относят граммотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 24 часов, с отрицательным оксидазным тестом.

Число лактозоположительных кишечных палочек определяют методом мембранных фильтров или титрационным методом.

4.1. Метод мембранных фильтров.

4.1.1. Объем воды для посева.

Объем воды выбирают в зависимости от степени ее предполагаемого загрязнения с таким расчетом, чтобы не менее чем на 2-х фильтрах выросли изолированные колонии, среди которых не более 30 колоний относятся к бактериям группы кишечных палочек. При этом можно ориентироваться на результаты предыдущих исследований и на рекомендации таблицы в Приложении 1.

При исследовании воды неизвестной степени бактериального загрязнения следует засеивать не менее 4-х десятикратных ее объемов.

4.1.2. Выполнение анализа.

Для фильтрования используют мембранные фильтры со средним диаметром пор 0,5 мкм.

Подготовку мембранных фильтров к анализу осуществляют в соответствии с инструкцией завода-изготовителя.

Фильтрование воды выполняют с помощью специальных приборов с соблюдением правил стерильности. Фильтруют сначала меньшие, а затем большие объемы воды через один фильтровальный аппарат, меняя каждый раз фильтры. При фильтровании 1 мл воды в воронку наливают сначала 5 - 10 мл стерильной воды, а затем вносят анализируемую воду с последующим созданием вакуума.

После окончания фильтрования мембранный фильтр снимают при сохранении вакуума для удаления излишка влаги на нижней стороне фильтра. Фильтр переносят на среду Эндо не переворачивая и добиваются полного прилегания его к среде без пузырьков воздуха. На одну чашку можно поместить несколько фильтров, но с условием, чтобы они не соприкасались.

Если анализируемая вода содержит большое количество взвешенных веществ или клеток фитопланктона, то ее фильтруют сначала через фильтр со средним диаметром пор 4 мкм для удаления крупной взвеси, который помещают в фильтровальный прибор, накладывая на фильтр с диаметром пор 0,5 мкм. После окончания фильтрования фильтры переносят на среду Эндо отдельно и при выведении результатов анализа учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

4.1.3. Инкубация посевов.

Чашки с посевами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 16 - 18 часов.

4.1.4. Учет результатов.

Для учета выбирают фильтры, на которых выросли изолированные колонии и число колоний, характерных для лактозоположительных кишечных палочек, не более 30. Допустимо вести учет по 1 фильтру или на фильтрах с более густым ростом, но с обязательной оговоркой в приложении к протоколу анализа.

Выполняют оксидазный тест. Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями переносят на кружок фильтровальной бумаги несколько большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом для определения оксидазной активности. Через 2 - 5 мин. после достаточно четкого проявления реакции (сине-

фиолетовая окраска ободка или всей колонии оксидазоположительных бактерий) фильтр переносят обратно на среду и учитывают результат.

Примечание. При необходимости сохранения жизнеспособности бактерий, выросших на фильтрах, следует учитывать бактерицидность реактива для определения оксидазного теста. Поэтому высев колоний в полужидкую среду с лактозой и другие среды производят немедленно после проявления реакции и не позднее 5 - 7 мин. от начала контакта с реактивом.

Все колонии, которые приобрели сине-фиолетовую окраску, из учета исключают. Среди колоний, не изменивших первоначального цвета (оксидазоотрицательных), подсчитывают количество темно-красных и красных с металлическим блеском и без него, а также розовых слизистых крупных выпуклых, розовых с темно-красным центром (с отпечатками на обратной стороне фильтра до выполнения оксидазного теста).

При лабораторно-производственном контроле за эксплуатируемыми объемами анализ может быть завершен на этом этапе.

Анализ продолжают в следующих случаях:

- при выборе нового источника водоснабжения;
- при арбитраже;
- при небольшом опыте работы выполняющего анализ;
- при отсутствии достаточно четкой дифференциации лактозоположительных колоний и других.

В этих случаях по 2 - 3 колонии каждого подсчитанного типа оксидазоотрицательных колоний пересевают в полужидкую среду с лактозой. Инкубация посевов и учет результатов описаны в п. 4.1.5.

4.1.5. Учет результатов при отсутствии реактива для определения оксидазного теста.

На мембранных фильтрах, на которых выросли изолированные колонии и число колоний кишечных палочек не более 30, подсчитывают отдельно каждый тип колоний, которые по морфологии и окраске можно предположительно отнести к ферментирующим лактозу кишечным палочкам (темно-красные с металлическим блеском, темно-красные без блеска, красные, розовые с красным центром, розовые выпуклые слизистые и других оттенков с отпечатками на обратной стороне мембранных фильтров).

По 3 - 4 колонии каждого подсчитанного отдельного типа микроскопируют после окраски по Граму по ГОСТ 18963-73, пересевают уколом до дна пробирки в полужидкую среду с лактозой. Посевы инкубируют в течение 5 - 6 часов при температуре 37 +/- 0,5 град. С. Через 5 - 6 часов учитывают результат. При наличии кислоты и газа исследуемую колонию относят к лактозоположительным кишечным палочкам, при отсутствии изменения среды - не учитывают. При наличии кислоты посевы оставляют в термостате и окончательный учет производят через 24 часа.

В тех лабораториях, где учет результатов на полужидкой среде с лактозой не может производиться через 5 - 6 часов, следует применять лактозо-пептонную среду с поплавками. В этом случае учет результатов производят через 18 - 24 часа.

Подсчитывают сумму колоний таких типов колоний, которые ферментируют лактозу до кислоты и газа. Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то для вычисления числа лактозоположительных колоний этого типа

используют формулу $\frac{a \times c}{b}$, где: а - общее число колоний данного типа, в - число проверенных из них, с - число положительных ответов.

4.1.6. Вычисление числа лактозоположительных кишечных палочек.

Результаты анализа выражают в виде числа лактозоположительных кишечных палочек в 1 л воды (коли-индекс). Суммируют количество колоний лактозоположительных кишечных палочек на таких фильтрах, где выросли изолированные колонии и число кишечных палочек не превышает 30, и делят на объем воды, профильтрованный через эти фильтры, выраженный в литрах.

При отсутствии на фильтрах колоний кишечных палочек коли-индекс будет меньше той величины, которая была бы определена в случае обнаружения в анализируемом объеме одной клетки кишечной палочки. Например, при посеве 10 и 40 мл воды на фильтрах не выросло ни одной колонии кишечных палочек. Коли-индекс будет менее 20 (1 : 0,05 л = 20).

4.1.7. При отсутствии в 10 и 40 мл лактозоположительных кишечных палочек и несоответствии полученных результатов с данными санитарного обследования оцениваемого водного объекта следует обратить внимание на лактозоотрицательные колонии и провести анализ по п. 4.2.12 ГОСТ 18963-73.

4.2. Титрационный метод.

4.2.1. Объем воды для посева.

Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы в минимальных объемах или в наиболее высоком разбавлении получить один или несколько отрицательных результатов. При этом можно ориентироваться на результаты предыдущих исследований воды в этом же месте водоема и на рекомендации таблицы в Приложении 2, а также таблицы расчета индекса в Приложении 3.

Выбирают схему посева в 2 или 3 параллельных рядах, учитывая при этом, что чем больше повторностей, тем выше степень точности получаемых результатов.

4.2.2. Выполнение анализа.

Каждый объем воды или ее разбавления засевают параллельно в 2 или 3 порции лактозо-пептонной среды. 50 мл анализируемой воды вносят во флаконы с 15 мл концентрированной лактозо-пептонной среды. 1 мл пробы воды и 1 мл из разбавлений вносят в пробирки с 10 мл среды нормальной концентрации.

Посевы инкубируют при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 24 часов.

4.2.3. Учет результатов.

Полное отсутствие изменения среды или помутнение без образования газа позволяет дать отрицательный ответ.

Из посевов в среду накопления, где отмечено помутнение и газообразование, производят высев на поверхность подтверждающей плотной фуксин-сульфитной среды Эндо, разделенной на 3 - 4 сектора с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 16 - 18 часов.

При наличии в среде накопления помутнения и газообразования, а при высевах на подтверждающую среду характерных для лактозоположительных кишечных палочек колоний (темно-красных с металлическим блеском и без него) дают положительный ответ.

Время анализа 42 часа.

В тех случаях, когда имеет место сомнительная реакция в средах накопления (небольшое газообразование) или колонии на среде Эндо выросли не характерного для лактозоположительных кишечных палочек вида (слизистые розовые, красные плоские, розовые с красным центром и др.), подтверждают принадлежность выросших колоний к лактозоположительным кишечным палочкам. По две колонии каждого типа микроскопируют с окраской по Граму, засевают в полужидкую среду с лактозой уколом до дна пробирки и инкубируют посевы при температуре 37 град. С. Через 5 - 6 часов инкубации посевов производят учет. При образовании кислоты и газа хотя бы в одной пробирке грамотрицательными палочками дают положительный ответ на наличие ЛКП в исследуемом объеме. При отсутствии изменений среды дают отрицательный ответ. При наличии только кислоты окончательный результат учитывают через 24 часа.

Время анализа 48 - 72 часа.

Для подтверждения способности бактерий ферментировать лактозу можно использовать и лактозо-пептонную среду накопления с поплавами. Учет результатов в этом случае следует производить через 24 часа.

Примечание. В целях ускорения идентификации выросших на среде Эндо колоний допускается вместо подтверждения способности ферментировать лактозу определить оксидазный тест.

В сомнительных случаях (описанных в п. 4.2.3) на колонии, выросшие на среде Эндо, накапливают реактив для определения оксидазной активности. При наличии в среде накопления газа и на среде Эндо колоний одного из следующих видов: темно-красных с металлическим блеском или без него, слизистых, розовых, красных крупных, с темно-красным центром, не изменивших окраску после накапывания реактива и образованных грамотрицательными палочками, дают положительный ответ.

Если все колонии на секторе под воздействием реактива окрасились в сине-фиолетовый цвет или остались без изменения только розовые плоские лактозоотрицательные колонии, дают отрицательный ответ.

4.2.5. Вычисление коли-индекса.

После определения положительных и отрицательных результатов на наличие лактозоположительных кишечных палочек в объемах воды, засеянных в среду накопления, вычисляют коли-индекс по таблицам в Приложении 3.

Для расчета выбирают 3 таких последовательных десятикратных разбавления или объема воды, засеянной в среду накопления, в которых получены как положительные, так и отрицательные результаты. Если имеют место сочетания положительных и отрицательных результатов, отсутствующие в таблицах, то при повторении таких сочетаний более чем в 1% случаев следует искать причины в неправильной технике выполнения анализа.

4.2.6. При отсутствии лактозоположительных кишечных палочек в 50 и 10 мл и несоответствии полученных результатов с данными санитарного обследования оцениваемого водного объекта следует обратить внимание на те сектора, где выросли лактозоотрицательные колонии (розовые, бесцветные плоские и др.), и провести анализ по п. п. 4.2.19 - 4.2.22 ГОСТ 18963-73 (отметить в протоколе анализа).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

5. Определение числа *Escherichia coli*

К группе кишечных палочек, обозначаемых как *E. coli*, относят такие лактозоположительные кишечные палочки, которые ферментируют лактозу при температуре 44,5 град. С и образуют индол при этой же температуре. В эту группу могут входить бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter* и реже *Enterobacter*, обладающие перечисленными свойствами.

E. coli определяют при оценке качества воды поверхностных водоемов для расшифровки характера и происхождения микробного загрязнения, превышающего норматив. При оценке полученных данных имеет значение число *E. coli* в воде и их соотношение с лактозоположительными кишечными палочками.

Наличие в воде *E. coli* свыше 1000 в 1 л свидетельствует о недавнем поступлении хозяйственно-фекального загрязнения, о незавершенных процессах самоочищения, о несоблюдении требований к очистке сточных вод и т.п. В этих случаях соотношение числа лактозоположительных кишечных палочек и *E. coli*, как правило, менее 10 и водоем представляет потенциальную эпидемическую опасность.

5.1. Метод мембранных фильтров.

5.1.1. Выполнение анализа.

Для определения числа *E. coli* используют посеы, которые сделаны на мембранные фильтры для проведения анализа на лактозоположительные кишечные палочки.

На фильтрах или на чашках, где выросли изолированные колонии, подсчитывают темно-красные колонии с металлическим блеском. Каждую колонию или часть из них, но не менее 15, пересевают параллельно в две пробирки с полужидкой средой с лактозой (или с лактозо-пептонной средой с поплавками) и со средой для определения образования индола (бульон Хоттингера или другой, содержащий триптофан). Среда должна быть предварительно нагрета на водяной бане до температуры около 44 град. С. Засеянные пробирки вместе с водяной баней переносят в термостат и инкубируют посеы при температуре 44,5 +/- 0,2 град. С.

Для упрощения идентификации (совмещение определения ферментации лактозы и образования индола в одной пробирке) можно использовать среду ФКП-1 и инкубировать посеы при температуре 43 +/- 0,5 град. С в течение 24 часов.

Продукцию индола определяют одним из общепринятых методов (с помощью индикаторных бумажек или с реактивами Эрлиха, Ковача и т.п.). Положительный ответ дают при наличии газа в лактозных средах и при образовании индола.

Для упрощения исследования каждую колонию пересевают в лактозный бульон с борной кислотой, соблюдая описанные выше условия посева. Посеы инкубируют при температуре 43 +/- 0,5 град. С в течение 24 часов. Положительный ответ дают при наличии газообразования. Признаки роста (помутнение) без образования газа во внимание не принимают. При использовании этой среды индол не определяют.

5.1.2. Учет результатов.

Если проверены все темно-красные колонии с металлическим блеском, то результат вычисляют так, как это описано для метода мембранных фильтров. Если проверена часть колоний и при выборочной проверке темно-красных колоний не все дали положительный результат, то количество *E. coli* в 1 л воды определяют по

$$a \times c \times 1000$$

формуле $\frac{a \times c \times 1000}{b \times V}$, где: а - общее количество темно-красных с

металлическим блеском колоний; в - число проверенных из них; с - количество положительных ответов; V - объем воды в мл, профильтрованный через фильтры, на которых велся учет.

5.2. Титрационный метод.

Если в посевах в среду накопления обнаружен газ, а при высеве на среду Эндо выросли темно-красные колонии с металлическим блеском, то по 2 - 3 такие колонии с каждого сектора засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой и бульоном Хоттингера. Анализ выполняют по п. 5.1.1.

Срок анализа может быть сокращен на сутки, если из сред накопления, где обнаружен газ, одновременно с высевом на среду Эндо для подтверждения наличия лактозоположительных кишечных палочек производят высев в среды с лактозой для подтверждения наличия *E. coli*.

Поскольку анализ выполняют не с чистыми культурами, то используют лактозные среды с ингибиторами (лактозный бульон с борной кислотой, с бриллиантовым зеленым или среду ФКП-1), предварительно нагретые на водяной бане до температуры 43 - 44 град. С.

Высев делают пипеткой в количестве 2 - 3 капель. При использовании лактозного бульона с борной кислотой или среды ФКП-1 посеvy инкубируют при температуре 43 +/- 0,5 град. С, определяя при этом преимущественно *E. coli*.

При использовании лактозного бульона с бриллиантовым зеленым посеvy инкубируют при температуре 44,5 +/- 0,2 град. С. Через 24 часа при наличии газа учитывают как положительный результат.

После установления положительных и отрицательных результатов в посеянных в среды накопления объемах воды на наличие *E. coli* определяют их число в 1 л воды по таблицам в Приложении 3.

6. Определение числа энтерококков

Энтерококки рекомендуется определять для подтверждения фекального характера загрязнения, например при превышающем нормативы числе лактозоположительных кишечных палочек и числе *E. coli* менее 500 - 1000 в 1 л воды или при несоответствии оценки качества воды по коли-индексу и санитарной ситуации на водных объектах.

При индексе энтерококков свыше 500 предполагается поступление свежего фекального загрязнения и опасность в эпидемическом отношении.

Энтерококки - грамположительные, полиморфные, круглые, чаще слегка вытянутые с заостренными концами клетки, располагающиеся попарно или в коротких цепочках.

В группу энтерококков относят два вида фекальных стрептококков - *Str. faecalis* с биоварами *liquefaciens* и *zymogenes*, имеющие основное индикаторное значение, и *Str. faecium* с биоваром *durans*.

6.1. Метод мембранных фильтров.

6.1.1. Объем воды для посева.

Объем испытуемой воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы не менее чем на 2-х фильтрах выросли изолированные колонии в количестве от 5 до 50.

При этом можно ориентироваться на результаты предыдущих исследований воды в этом же месте водоема и на рекомендации Приложения 1.

При исследовании воды неизвестного качества количество засеваемых десятикратных объемов увеличивают до 4-х.

6.1.2. Выполнение анализа.

Через мембранные фильтры профильтровывают 2 - 3 десятикратных объема испытуемой воды так, как это описано в п. 4.1.2.

Фильтры с посевом помещают на азидную среду или среду ЖСТ и инкубируют при температуре 37 +/- 0,5 град. С в течение 24 - 28 часов.

6.1.3. Учет результатов на среде ЖСТ.

Учет результатов на среде ЖСТ производят через 24 - 28 часов. Для учета выбирают фильтры, на которых выросло не более 20 - 30 колоний. Подсчитывают характерные для энтерококков колонии: плоские крупные с ровными краями, белые или бледно-окрашенные с небольшим кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Последние образованы *Str. faecalis*.

Если выросли колонии другого вида - выпуклые белые мелкие или ярко окрашенные, то их принадлежность к энтерококкам можно подтвердить по отсутствию каталазной активности и по характерной морфологии клеток при микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

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

6.1.4. Учет результатов на азидной среде.

Для учета выбирают фильтры, на которых выросло от 5 до 50 колоний.

Подсчитывают колонии, характерные для энтерококков: выпуклые, с ровными краями, розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным не четко оформленным центром.

Как правило, все колонии, которые растут на азидной среде, можно отнести к фекальным стрептококкам, имеющим индикаторное значение.

Очень мелкие (на пределе видимости невооруженным глазом), плоские разных оттенков колонии не учитывают.

При необходимости подтвердить наличие энтерококков по 2 - 3 колонии каждого типа микроскопируют после окраски по Граму.

При обнаружении в мазках грамположительных полиморфных, как правило, слегка вытянутых с заостренными концами диплококков дают положительный ответ.

6.1.5. Вычисление индекса энтерококков.

Подсчитанное число колоний энтерококков суммируют и делят на объем воды в литрах, профильтрованный через фильтры, на которых велся подсчет.

6.2. Титрационный метод.

6.2.1. Объем воды для исследования.

Объем воды выбирают с таким расчетом, чтобы в минимальных объемах или в наиболее высоком разбавлении получить один или несколько отрицательных результатов. При этом следует ориентироваться на результаты предыдущих анализов воды в этом же месте водоема и на рекомендации Приложения 2.

6.2.2. Выполнения анализа.

Каждый объем воды или ее разбавление засевают параллельно в 2 или 3 порции щелочно-полимиксиновой среды (ЩЭС). Объемы 100, 50 и 10 мл засевают в равные объемы среды двойной концентрации. 1 мл исследуемой воды или ее разбавления засевают в 5 мл среды обычной концентрации. Посевы инкубируют при температуре 37 +/- 0,5 град. С.

6.2.3. Учет результатов.

Через 24 часа производят предварительный учет. Высевают на 4 - 6 секторов плотной молочно-ингибиторной среды из порции среды накопления, где отмечены признаки роста (помутнение или помутнение и изменение цвета среды). Порции среды, в которых признаки роста отсутствуют, оставляют при температуре 37 +/- 0,5 град. С еще 24 часа, после чего из сосудов, в которых дополнительно появилось помутнение и изменение цвета среды, делают высев на сектора молочно-ингибиторной среды.

Через 24 - 48 часов инкубации посев на молочно-ингибиторной среде при температуре 37 +/- 0,5 град. С в качестве положительных результатов отмечают наличие аспидно-черных, выпуклых с металлическим блеском, а также сероватых мелких колоний.

Молочно-ингибиторная среда позволяет дифференцировать виды энтерококков: *Str. faecalis* образует аспидно-черные выпуклые колонии с металлическим блеском; *Str. faecalis* биовар *liquefaciens* - такие же колонии, окруженные зоной просветления с выпадением по периферии осадка параказеина повышенной мутности; *Str. faecium* и биовар *durans* - серые, мелкие, плоские колонии.

В сомнительных случаях убедиться в наличии на секторах энтерококков можно путем микроскопии после окраски мазков по Граму. Обнаружение слегка вытянутых с заостренными концами диплококков, часто располагающихся короткими цепочками, свидетельствует о росте на секторах энтерококков. Число энтерококков в 1 л исследуемой воды определяют по таблицам в Приложении 3.

Титрационный метод с использованием среды ЩЭС и посевом в 3-х параллельных рядах позволяет получать наиболее точные данные о содержании в воде энтерококков.

6.3. Упрощенный метод.

Допускается использовать лактозо-пептонную среду не только для накопления кишечных палочек, но и для накопления энтерококков. Упрощенный метод может быть применен при исследовании воды водоемов, где уровень загрязнения по коли-индексу не превышает 100 тыс. Метод непригоден при исследовании сточных вод и воды водоемов в местах их выпуска, т.к. дает заниженный результат.

Анализ выполняют по п. 4.2. После высева на сектора среды Эндо посевы в лактозо-пептонной среде продолжают инкубировать до 48 часов при температуре 37 +/- 0,5 град. С. Из посевов, где имеет место помутнение, независимо от наличия или отсутствия газа, делают высев на одну из элективных подтверждающих сред (ЖСТ, азидную). При этом необходимо соблюдать следующие условия: часть среды осторожно, не взбалтывая, слить, оставшуюся часть размешать и троекратно нанести материал бактериологической петлей диаметром 2 - 3 мм на поверхность плотной среды. Посев производят штрихом, к концу которого должны быть получены изолированные колонии.

При росте на подтверждающей среде характерных для энтерококков колоний (как это описано в п. п. 6.1.3 и 6.1.4) дают положительный ответ.

При необходимости подтвердить наличие энтерококков на секторах делают микроскопию окрашенных по Граму мазков, а при работе на среде ЖСТ - еще и каталазный тест. Обнаружение в мазках грамположительных слегка вытянутых диплококков с заостренными концами и отрицательная каталазная проба свидетельствуют о росте энтерококков. Индекс энтерококков определяют по таблицам в Приложении 3.

7. Метод определения числа стафилококков

Стафилококки определяют в воде водоемов, используемых для купания, как показатель загрязнения воды микрофлорой верхних дыхательных путей и кожных покровов человека.

При оценке качества воды индикаторными считают стафилококки, обладающие лецитовителлазной активностью, в основном *Staph. aureus*. Сигнальное значение для регламентации нагрузки на зону купания имеет наличие свыше 100 стафилококков в 1 л воды.

7.1. Метод мембранных фильтров.

7.1.1. Выполнение анализа.

Пробу в объеме 50 мл фильтруют через 2 - 3 фильтра с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии.

Фильтры помещают на молочно-желточно-солевой агар (МЖСА) и инкубируют при температуре 37 град. С в течение 24 часов.

7.1.2. Учет результатов.

Подсчитывают блестящие выпуклые колонии белого, палевого, золотистого цвета, окруженные радужной с перламутровым блеском зоной. 96 - 98% таких колоний образованы.

При необходимости подтвердить принадлежность таких бактерий к *Staph. aureus* подозрительные колонии пересевают на молочно-желточный агар бляшками, микроскопируют, определяют плазмокоагулязную активность (методика описана в "Методических рекомендациях по видовой идентификации стафилококков" N 1922-78). При наличии мелких грамположительных кокков, располагающихся в виде гроздей, и коагулировании плазмы дают положительный ответ.

7.1.3. Вычисление результатов.

Число колоний стафилококков делят на объем воды, профильтрованной через фильтры, на которых велся учет, и умножают на 1000.

7.2. Титрационный метод.

Делают посевы 10, 1 и 0,1 мл исследуемой воды в 2 - 3 повторностях в стерильную солевую пептонную воду. 1 мл и 0,1 мл вносят в среду накопления, содержащую 10% хлорида натрия и 1% пептона.

Для посева 10 мл заготавливают впрок сухие навески хлорида натрия по 1 г, стерилизуя их сухим жаром, и 25-процентный стерильный раствор пептона.

К 10 мл исследуемой воды прибавляют соответственно 1 г хлорида натрия и 1 мл 25-процентного раствора пептона.

Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 48 часов. Высев из посевов производят на молочно-желточный агар и учитывают результаты, как это описано в п. 7.1.2.

Вычисление числа стафилококков в 1 л воды производят по соответствующим таблицам Приложения 3.

8. Определение числа БОЕ фагов кишечных палочек

Определение числа бляшкообразующих единиц (БОЕ) фагов кишечных палочек в воде осуществляется в том случае, если невозможно или затруднено проведение исследований на содержание кишечных вирусов.

При содержании фагов кишечных палочек более 1000 в 1 л воды источника представляет эпидемическую опасность в отношении кишечных вирусных инфекций.

Определение числа фагов кишечных палочек проводится методом агаровых слоев.

Сущность метода заключается в определении в 1 - 5 мл исследуемой воды БОЕ, способных лизировать кишечные палочки и давать негативные колонии на бактериальном газоне.

8.1. Подготовка к анализу.

1,5% мясо-пептонный агар в количестве 25 - 30 мл накануне исследования разливают по стерильным чашкам Петри. Чашки, прикрытые стерильной бумагой, высушивают под бактерицидной лампой в течение 1 часа, затем закрывают крышками и оставляют на ночь при комнатной температуре в перевернутом виде.

Предварительно разлитый в пробирки в количестве 3 мл 0,8% мясо-пептонный агар расплавляют и остужают до 46 - 48 град. С. В пробу воды объемом 10 мл для освобождения от бактериальной микрофлоры прибавляют 1 - 2 мл хлороформа, тщательно встряхивают и оставляют на 15 мин. для осаждения хлороформа. На исследование берут воду над хлороформом.

8.2. Выполнение анализа.

Обработанную пробу воды наносят по 1 мл на поверхность 1,5-процентного агара в 3 чашки Петри.

В пробирку с 0,8-процентным мясо-пептонным агаром добавляют 0,1 - 0,2 мл взвеси 18-часовой культуры *E. coli*, выделенной из пробы воды исследуемого водоема, и тщательно перемешивают, вращая

пробирку. Смесь выливают на поверхность зараженного агара и оставляют для затвердевания на 30 мин. при комнатной температуре. Затем чашки в перевернутом виде помещают в термостат при температуре 37 град. С.

8.3. Учет результатов.

Учет результатов проводят через 18 - 24 часа. Число БОЕ, образовавшихся на всех 3 чашках, пересчитывают на общий объем (1 л) исследуемой пробы воды и выражают в индексе фага.

9. Определение бактерий родов сальмонелла и шигелла

Исследование воды на сальмонеллы и шигеллы проводят при неблагоприятной санитарной и эпидемической обстановке, а также при превышении нормативов по коли-индексу.

При выборе источника водоснабжения и контроле за эпидситуацией водного объекта, используемого в целях рекреации, выделенные из воды сальмонеллы тифа, паратифов и шигеллы свидетельствуют об эпидемической опасности данного водного объекта. При выделении из воды вышеуказанных патогенных энтеробактерий водный объект не может служить источником водоснабжения и для рекреационных целей.

Методы определения бактерий родов сальмонелла и шигелла, помимо качественной оценки, предполагают и их количественное определение. Методы количественного определения могут быть применены в случаях оценки эффективности очистки и обеззараживания воды на очистных канализационных сооружениях, при оценке процессов самоочищения водоемов от патогенных микроорганизмов, при проведении научных исследований по изучению связи между уровнем микробного загрязнения воды и заболеваемостью населения кишечными инфекциями водного происхождения.

Сущность определения заключается в использовании методов накопления патогенных энтеробактерий в средах обогащения с последующим пересевом на плотные селективные и дифференциальные среды. Затем проводят изучение биохимических свойств выделенных культур и их серологическую идентификацию по методике, утвержденной МЗ СССР.

9.1. Ход определения.

Используют не менее двух сред накопления: 1 - среду Мюллера - Кауфмана, 2 - селенитовый бульон, 3 - магниевую среду, 4 - среду с охмеленным суслом. Для сальмонелл используют любые две среды из четырех, для шигелл - 2-ю и 4-ю методику Ростовского ИЭМГ (Р.С. Хомик). При отсутствии необходимости определения количества сальмонелл исследуемую воду в количестве 1 л делят на две порции по 500 мл. В каждые 500 мл вносят накопительные среды по п. п. 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6. Посевы воды инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов, затем из каждого флакона делают высевы бактериологической петлей на чашки с плотными селективными средами: для сальмонелл висмут-сульфитный агар, для шигелл - на агар ЭМС и бактоагар Плоскирева с антибиотиками и без них. Чашки с посевами инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов, а в случае отсутствия роста чашки с посевами ставят еще на 24 часа в термостат. С каждой чашки снимают подозрительные на сальмонеллы и шигеллы колонии в пробирки с дифференциально-диагностическими средами. Окончательное определение биохимических и серологических свойств, био- и сероваров проводят по действующим инструкциям МЗ СССР.

9.2. Посев воды в среду Кауфмана.

500 мл исследуемой воды засевают по прописи 2.4.15, 2.4.16. Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов.

9.3. Посев воды в селенитовый бульон.

К 500 мл воды добавляют 500 мл основного раствора (буфера по прописи 2.4.17.1), 40 мл 10% раствора натрия кислого селенистоокислого (по прописи 2.4.17.2). Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов.

9.4. Посев в магниевую среду при отсутствии необходимости количественного определения сальмонелл.

К 500 мл исследуемой воды прибавляют навески и растворы ингредиентов по прописи 2.4.18. Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов.

9.4.1. Посев в магниевую среду для количественного определения сальмонелл.

В случае необходимости количественного определения сальмонелл можно определять их концентрацию из двух способов посева в магниевую среду: 1 - титрованием в 2 или 3 параллельных рядах десятикратных разбавлений от 100 мл х 2 или х 3 до 1,0 мл, прибавляя навески и растворы по прописи 2.4.18. Индекс сальмонелл определяют по таблице для определения индекса бактерий группы кишечных палочек. Приложение 3.

2 - к 600 мл исследуемой воды добавляют: магния хлористого кристаллического 23,4 г; хлористого натрия 4,8 г; калия фосфорнокислого однозамещенного (безводного) 1 г; 10% р-ра пептона 30 мл; дрожжевого экстракта 13,2 мл и 0,1% водного раствора бриллиантового зеленого 3 мл. Затем воду с внесенными ингредиентами разливают на 4 объема: 550 мл, 55 мл, 5,5 мл и 0,55 мл.

Повторность одно-двукратная. Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов. Индекс сальмонелл определяют по таблицам в Приложениях 4, 5.

9.5. Посев воды в среду с охмеленным суслом (при отсутствии необходимости количественного определения сальмонелл и для определения шигелл).

В 500 мл исследуемой воды добавляют среду с охмеленным суслом, приготовленную по прописи 2.4.19. Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов.

9.5.1. Посев воды в среду с охмеленным суслом для количественного определения сальмонелл.

Исследуемую речную воду раститровывают на 500, 50, 5 и 0,5 мл в одной или двукратной повторностях и добавляют приготовленную *ex tempore* среду с охмеленным суслом в соотношении 1:4 (по прописи 2.4.19.1). Посевы инкубируют при температуре 37 град. С в течение 18 - 20 часов. Индекс сальмонелл определяют по таблицам в Приложениях 4, 5.

9.6. Посев воды по методу Ростовского-на-Дону НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены (Р.С. Хомик, А.А. Рындич).

Применяется только для определения шигелл. В 0,5 - 1 л исследуемой воды добавить 5 - 10 мл 1% мясо-пептонного бульона по ГОСТ 18963-73 и поставить в термостат при температуре 37 град. С. Через 24 часа инкубации в термостате производят:

1. Прямой высев петлей на дифференциально-селективные среды: Плоскирева, Эндо, с эозиновым метиленовым синим. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37 град. С на 24 часа.

2. Готовят разведения воды в накопительных средах: желчном
-1
(2.4.21) и селенитовом (2.4.17.1; 2.4.17.2) бульонах от 10 до
-5

10 , исходя из 0,5 мл воды на 4,5 мл среды. Посевы помещают в термостат при температуре 37 град. С. Через 24 часа инкубации делают высев на указанные выше дифференциально-селективные среды. Дальнейшие исследования проводят согласно действующим инструкциям.

9.7. Учет результатов на висмут-сульфитном агаре.

На висмут-сульфитном агаре колонии сальмонелл круглые, черные, с сероватым металлическим ободком вокруг них, зеленые с темным центром и без него, вызывающие потемнение среды под колонией.

9.8. Учет результатов на ЭМС-агаре.

Все шигеллы на ЭМС-агаре вырастают в виде круглых, прозрачных, нежных, бесцветных колоний. Колонии шигелл Зонне более плотные, иногда белесоватые, с изрезанными краями.

9.9. Учет результатов на бактоагаре Плоскирева.

На бактоагаре Плоскирева шигеллы растут в виде бесцветных прозрачных, нежных колоний, слегка возвышающихся над поверхностью агара (шигеллы Флекснера). Колонии шигелл Зонне бывают иногда крупные, белесоватые, приобретающие через 48 часов слегка розовый оттенок.

9.10. Окончательное определение биохимических и серологических свойств, био- и сероваров проводят по действующим инструкциям МЗ СССР.

10. Определение наличия кишечных вирусов

Вирусологические исследования качества воды поверхностных водоемов проводятся в лабораториях республиканских, краевых и областных СЭС. Условия отбора и доставки проб см. в разделе 1.

На исследование берется проба воды объемом 1 л.

Сущность метода обнаружения кишечных вирусов в исследуемом объеме воды заключается в предварительном концентрировании их путем осаждения сернокислым алюминием или фильтрования через фильтры и последующем вирусологическом исследовании концентрата.

Санитарно-вирусологические исследования проводятся согласно "Методическим указаниям по индикации и идентификации цитопатических вирусов в объектах окружающей среды".

**СХЕМА ПОСЕВА ВОДЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТОВ
ПРИ РАБОТЕ МЕТОДОМ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ**

Объект исследования	Объем засеваемой воды в мл для определения	
	лактозоположительных кишечных палочек	энтерококков
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	40; 10; 1	50; 10
Водоемы, загрязняемые сточными водами	10; 1; 0,1; 0,01	10; 1; 0,1
Водоемы в зоне влияния выпуска сточных вод	1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001	1; 0,1; 0,01; 0,001

**СХЕМА ПОСЕВА ВОДЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТОВ
ПРИ РАБОТЕ ТИТРАЦИОННЫМ МЕТОДОМ**

Объем исследования	Объем засеваемой воды (в мл) при определении	
	кишечных палочек	энтерококков
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	50; 5 повторностей по: 10; 1 2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1; 0,01	50; 5 повторностей по: 10; 1 2 или 3 повторности по: 100; 10; 1
Водоемы, загрязняемые сточными водами	2 или 3 повторности по: 1; 0,1; 0,01; 0,001	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1; 0,01
Водоемы в зоне влияния выпусков сточных вод	2 или 3 повторности по: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001	2 или 3 повторности по: 1; 0,1; 0,01; 0,001

Примечание. Схему посева в 2-х или 3-х повторностях выбирают в зависимости от необходимой степени точности получаемых результатов.

Схему посева 50 мл, 5 по 10 мл и 5 по 1 мл используют при исследовании воды чистых водохранилищ.

**ТАБЛИЦА РАСЧЕТА ЧИСЛА БАКТЕРИЙ В 1 ЛИТРЕ ВОДЫ
(ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА)**

Число положительных объемов из			Число бактерий в 1 л
2-х объемов по 0,01 мл	2-х объемов по 0,1 мл	2-х объемов по 1 мл	
0	0	0	менее 500
0	0	1	500
0	0	2	900
0	1	0	500
0	1	1	900
0	1	2	1400
0	2	0	900
0	2	1	1400
0	2	2	1900
1	0	0	600
1	0	1	1200
1	0	2	1900
1	1	0	1300
1	1	1	2000
1	1	2	2800
1	2	0	2100
1	2	1	2900
1	2	2	3700
2	0	0	2300
2	0	1	5000
2	0	2	9500
2	1	0	6200
2	1	1	13000
2	1	2	21000
2	2	0	24000
2	2	1	70000
2	2	2	более 240000

**ТАБЛИЦА РАСЧЕТА ЧИСЛА БАКТЕРИЙ В 1 ЛИТРЕ ВОДЫ
(ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА)**

Число положительных объемов из			Число бактерий в 1 л (индекс)	Число положительных объемов из			Число бактерий в 1 л (индекс)
3 объемов по 1 мл	3 объемов по 0,1 мл	3 объемов по 0,01 мл		3 объемов по 1 мл	3 объемов по 0,1 мл	3 объемов по 0,01 мл	
			менее	2	0	0	910
0	0	0	300	2	0	1	1400
0	0	1	300	2	0	2	2000
0	0	2	600	2	0	3	2600
0	0	3	900	2	1	0	1500
0	1	0	300	2	1	1	2000
0	1	1	610	2	1	2	2700
0	1	2	920	2	1	3	3400
0	1	3	1200	2	2	0	2100
0	2	0	620	2	2	1	2800
0	2	1	930	2	2	2	3500
0	2	2	1200	2	2	3	4200
0	2	3	1600	2	3	0	2900
0	3	0	940	2	3	1	3600
0	3	1	1300	2	3	2	4400
0	3	2	1600	2	3	3	5300
0	3	3	1900	3	0	0	2300
1	0	0	360	3	0	1	3900
1	0	1	720	3	0	2	6400
1	0	2	1100	3	0	3	9500
1	0	3	1500	3	1	0	4300
1	1	0	730	3	1	1	7500
1	1	1	1100	3	1	2	12000
1	1	2	1500	3	1	3	16000
1	1	3	1900	3	2	0	9300
1	2	0	1100	3	2	1	15000
1	2	1	1500	3	2	2	21000
1	2	2	2000	3	2	3	29000
1	2	3	2400	3	3	0	24000
1	3	0	1600	3	3	1	46000
1	3	1	2000	3	3	2	110000
1	3	2	2400				более
1	3	3	2900	3	3	3	110000

**ТАБЛИЦА РАСЧЕТА ЧИСЛА БАКТЕРИЙ В 1 ЛИТРЕ ВОДЫ
(ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА)**

Число положительных объемов из			Число бактерий в 1 литре (индекс)
1-го объема по 50 мл	5-и объемов по 10 мл	5-и объемов по 1 мл	
0	0	0	менее 10
0	0	1	10
0	0	2	20
0	1	0	10
0	1	1	20
0	1	2	30
0	2	0	20
0	2	1	30
0	2	2	40
0	3	0	30
0	3	1	50
0	4	0	50
1	0	0	10
1	0	1	30
1	0	2	40
1	0	3	60
1	1	0	30
1	1	1	50
1	1	2	70
1	1	3	50
1	2	0	50
1	2	1	70
1	2	2	100
1	2	3	120
1	3	0	80
1	3	1	110
1	3	2	140
1	3	3	180
1	3	4	210
1	4	0	130
1	4	1	170
1	4	2	220
1	4	3	280
1	4	4	350
1	4	5	430
1	5	0	240
1	5	1	350
1	5	2	540
1	5	3	920
1	5	4	1600
1	5	5	более 2400

Примечание к пользованию таблицами определения индексов микроорганизмов.

При исследовании других объемов воды, помимо 1, 0,1 и 0,01, соответственно уменьшают или увеличивают индекс. Например, при исследовании объемов 10, 1 и 0,1 индекс уменьшают в 10 раз; при

исследовании объемов 0,1; 0,01 и 0,001 индекс увеличивают в 10 раз; при исследовании объемов 0,01; 0,001 и 0,0001 индекс увеличивают в 100 раз и т.д.

Если при исследовании воды сделан посев более чем 3-х десятикратных объемов воды или разбавлений, то учитывают 3 такие последовательные объема, в последнем из которых получен один или несколько отрицательных результатов. Например: 10 мл - обе пробирки положительны, 1 мл - то же, 0,1 мл - то же, 0,01 мл - то же, 0,001 мл - положительный результат только в одной пробирке. Учитывают объемы 0,1; 0,001 и 0,0001 мл.

Приложение 4

**ТАБЛИЦА КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА САЛЬМОНЕЛЛ
В ВОДЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ**

Объемы исследуемой воды				Индекс сальмонелл в 1 литре воды	Доверительные уровни сальмонелл в 1 л воды
500 мл	50 мл	5 мл	0,5 мл		
+	-	-	-	10	от единичных клеток до 50
+	+	-	-	100	от 50 до 250
+	+	+	-	500	от 250 до 1000
+	+	+	+	2000 и более	от 1000 и выше

**ТАБЛИЦА РАСЧЕТА ЧИСЛА САЛЬМОНЕЛЛ В 1 ЛИТРЕ ВОДЫ
(ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА)**

Число положительных результатов в объемах воды (при двух повторностях)				Число сальмонелл в 1 литре (индекс)
по 500 мл	по 50 мл	по 5 мл	по 0,5 мл	
2	2	2	1	1404
2	2	2	0	480
2	2	1	2	420
2	2	1	1	260
2	2	1	0	124
2	2	0	2	191
2	2	0	1	100
2	2	0	0	46
2	1	2	0	41
2	1	1	1	40
2	1	1	0	26
2	1	0	1	25
2	1	0	0	12
2	0	2	0	19
2	0	1	0	10
2	0	0	1	10
2	0	0	0	5
1	2	0	0	4
1	1	1	0	4
1	1	0	0	3
1	0	1	0	2
1	0	0	0	1
0	2	0	0	2
0	1	0	0	1
0	0	1	0	1