

МИНИСТЕРСТВО  
ЖИЛИЩНО-КОММУНАЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА РСФСР

---

ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
АКАДЕМИЯ КОММУНАЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА им. К. Д. ПАМФИЛОВА

РУКОВОДСТВО  
ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДА  
САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО  
КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД

Отдел научно-технической информации АКХ  
Москва, 1989

Министерство жилищно-коммунального хозяйства РСФСР

Ордена Трудового Красного Знамени

Академия коммунального хозяйства им. К.Д. Памфилова

Согласовано

Минздравом РСФСР  
Число № 07/5-693  
от 29 декабря 1986 г.

Утвержден

Начальник Главводоканала  
Минвостокхоза РСФСР  
Ю.И. Нифедов  
30 декабря 1987 г.

Р У К О В О Д С Т В О  
ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ МЕТОДА  
САНТАРИЧЕСКО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД

Отдел научно-технической информации АКХ  
Москва-1988

## О ГЛАВЛЕНИЕ

I. Общие положения . . . . .	4
II. Схема бактериологического контроля качества сточ- ных вод и воды загрязняемых ими водоемов . . . . .	5
III. Применение фильтрующих мембран Владипор марок МФЛ-МА № 5, 6, 7, 8 для определения содержания ЛКП или БГКП . . . . .	7
IV. Применение СИБ для идентификации ЛКП и БГКП . . .	17

---

---

В последние годы два новых отечественных материала – фильтрующие мембранны Владилор типа МФА-ИА и Системы индикаторные бумажные успешно использованы для совершенствования санитарно-бактериологического контроля качества питьевой воды.

С учетом этого опыта НИИ коммунального водоснабжения и очистки воды АКХ им. К.Д.Памфилова, трестом Росводоканалладка, кафедрой коммунальной гигиены I Московского медицинского института им. И.М.Сеченова, Горьковским НИИ эпидемиологии и микробиологии, трестом Мосочистводом проведены (1984–1986 гг.) исследования на сточных водах, которые показали, что вышенназванные материалы целесообразно использовать и при санитарно-бактериологической оценке качества сточных вод. На основании этих и ранее проводившихся методических работ, выполненных совместно с НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н.Сисина и I Московским медицинским институтом, составлено настоящее руководство.

Руководство предназначено для лабораторий производственных управлений водопроводно-канализационного хозяйства, выполняющих технологический контроль за работой сооружений по обработке сточных вод и контролирующих по обязательным санитарно-бактериологическим показателям эпидемиологическую безопасность прошедшей обработку сточной воды и воды водоснабжения, в который сточная вода сбрасывается. В этой части руководство может быть использовано и лабораториями санитарно-эпидемиологических станций. Основные положения руководства включены в Проект ГОСТ "Охрана природы. Гидросфера. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевых, природных и сточных вод".

## 1. ОБЩИЕ ПРИЧЕПЫ

1. При санитарно-бактериологической оценке качества городских сточных вод обязательным является определение коли-индекса. Этот контроль проводят по содержанию в сточных водах лактозоположительных кишечных палочек (ЛКП). Этот же показатель определяют при оценке качества воды водоема, в который сбрасывают сточные воды. В тех случаях, когда сточные воды подлежат дальнейшей утилизации в открытых системах технического водоснабжения, качество их контролируют по содержанию в них бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

Группа ЛКП или колиформных бактерий (по международной терминологии) включает всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* (грамотрицательные, не образующие спор палочки с отрицательным оксидазным тестом), ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 1-24 ч. Индекс ЛКП определяют методом мембранных фильтров, броильным (титрационным) методом или прямым посевом при предварительном содержании ЛКП выше 50 кл./см<sup>3</sup>.

Группа БГКП включает всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* (грамотрицательные, не образующие спор палочки с отрицательным оксидазным тестом), объединяемых по признаку ферментации глюкозы при температуре 37°C с образованием кислоты и газа в течение 1-24 ч. Индекс БГКП определяют методом мембранных фильтров или броильным (титрационным).

Индексы ЛКП и БГКП характеризуют степень фекального загрязнения воды водных объектов и косвенно – эпидемической опасности в отношении возбудителей кишечных инфекций.

2. Развитие в стране промышленного производства фильтрующих мембран Владипор марок МФА-МЛ № 5, 6, 7, 8 (выпускает Казанское производственное объединение "Тасма" им. В.В.Куйбышева Минхимпрома СССР), а также фильтровального аппарата для микробиологических анализов воды (индекс АФ, выпускают заводы Михайловского ГСХГ) позволяет более широко использовать при санитарно-бактериологическом контроле качества сточных вод метод мембранных фильтров. Преимущества, кото-

рие предоставляет использование этого метода, наиболее выражены в сравнении с бродильным методом: повышение точности анализа, сокращение его продолжительности, трудоемкости, экономия питательных сред, лабораторной посуды, электроэнергии. Отдельные из перечисленных положений верши и в сравнении с простым, удобным, точным методом прямого посева: возможность экономии лабораторной посуды, питательных сред. Однако основным преимуществом перед ним мембранных метода является возможность концентрирования исследуемых бактерий на мембранах, т.е. одновременное исследование большего объема сточной воды, что наиболее существенно при анализе обработанных сточных вод, в их числе и подлежащих утилизации.

3. Применение индикаторных бумажных систем (выпускает экспериментальный завод Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР) по сравнению с традиционной идентификацией бактерий семейства *Enterobacteriaceae* дает снижение трудозатрат (в основном в подготовительном периоде), возможность в ряде случаев сокращения продолжительности анализа, оно экономически целесообразно.

#### П. СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД И ВОДЫ ЗАПЛАВЛЕННЫХ ИМИ ВОДОЕМОВ

4. Методы выделения и идентификации бактерий, которые возможно использовать при анализе различных сточных вод и воды водоема, в который сбрасываются сточные воды, представлены в таблице.

5. Метод мембранных фильтров (с применением фильтрующих мембран Владивосток марок ЦРА-М № 5, 6, 7, 8, фильтров мембранных пироцеллулозных № 2, 3 (мытищинских) или других аналогичных мембран) может использоваться для выделения бактерий из необработанной, осветленной, очищенной, очищенной и хлорированной сточной воды, из воды водоемов.

Прямой посев следует применять при исследовании вод с индексом ЛК1 не ниже  $10^4$  мт/л: несработанной, осветленной и очищенной сточной воды, а также воды водоемов.

Т а б л и ц а

Приложение методов бактериологического анализа  
для контроля качества сточных вод и воды водоемов

Анализируемый объект	Анализирующий показатель	Метод выделения кишечных палочек			Метод идентификации кишечных палочек			
		Мембранный	Прямого посева	Бродильный	Окраска по Граму	СИБ	Оксидаза	Лактоза
Сточная вода:								
Необработанная	ЛКП	+	+	-	-	-	-	-
Осветленная	ЛКП	+	+	-	-	-	-	-
Очищенная:								
направляемая на обеззараживание	ЛКП	+	+	-	-	-	-	-
сбрасываемая в водоем	ЛКП	+	+	-	±	+	±	-
После обеззараживания:								
сбрасываемая в водоем или утилизируемая в закрытых системах технического водоснабжения	ЛКП	+	-	+	±	+	±	-
утилизируемая в открытых системах технического водоснабжения	БГКП	+	-	+	+	+	-	+
Вода водоема	ЛКП	+	+	-	±	+	±	-

П р и м е ч а н и е. "+" - целесообразный метод для данного определения; "-" - метод, применение которого для данного определения возможно, но менее целесообразно; "±" - исследование проводится только в сомнительных случаях или при неблагоприятной санитарно-эпидемиологической обстановке.

Бродильный метод целесообразно использовать при анализе сточной воды, подвергшейся хлорированию.

6. Идентификацию бактерий, выделенных из несработанной сточной воды и на этапах обработки ограничивают учетом по внешнему виду колоний на среде Эндо. Оксидазный тест, окраску по Граму, посевы на сахара не проводят.

При идентификации бактерий, выделенных из сточной воды, подлежащей сбросу в водоем или утилизации в закрытых системах технического водоснабжения, а также воды водоема, выполняют оксидазный тест. В сомнительных случаях или при неблагоприятной санитарно-эпидемиологической обстановке исследуют бактерии с помощью СИБ-лактозы или посевом в полужидкую среду с лактозой, производят окраску по Граму.

В тех случаях, когда идентифицируют бактерии, выделенные из сточной воды, подлежащей последующей утилизации в открытых системах технического водоснабжения, производят оксидазный тест с СИД-оксидазой или с реактивом, окраску по Граму, посев на СИБ-глюкозу или в полужидкую среду с глюкозой.

Ниже приводятся рекомендации по определению коли-индекса исследуемых вод с использованием новых материалов - фильтрующих мембран Владимира типа МФА-МА и СИБ.

Другие (традиционные) методы выделения и идентификации бактерий в настоящих рекомендациях не приводятся, поскольку они изложены ранее в "Методике технологического контроля работы очистных сооружений городской канализации" (М.:Стройиздат, 1977).

## Ш. ПРИМЕНЕНИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХ МЕМБРАН ВЛАДИМИРА МАРОК МФА-МА № 5, 6, 7, 8 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЛКИ ИЛИ БГКИ

### 1. Мембранные фильтровальные аппараты.

7. Отбор проб. Сточные воды отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил эпидемической безопасности для лиц, осуществляющих отбор пресс. При отборе хлорированной сточной

воды в емкость до ее стерилизации вносят серноватистокислый натрий из расчета 18-20 мг на 500 см<sup>3</sup> пробы сточной воды.

Пробы воды водоемов отбирают с соблюдением правил стерильности в стерильные емкости с глубиной 10-15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. При необходимости отбора проб на разных глубинах придонные пробы отбирают в 30-50 см от дна. Отбор проб производят в местах, где глубина водоема не менее 0,5 м. Используют различные плавсредства, мосты, помосты и т.п. Недопустимо производить отбор проб с берега. Проруби делают, избегая внесения в воду загрязнений со льда и инструментов. При отборе нескольких проб одним батометром его каждый раз обеззараживают фlamбированием. Отобранные пробы маркируют. Места отбора проб и кратность устанавливают в соответствии с документами подчино-санитарного законодательства, действующими для каждого объекта.

8. Хранение проб. Анализ должен быть проведен в пределах 2 ч после отбора пробы. Допускается хранение пробы при температуре 4-10°C в течение 6 ч.

9. Транспортирование проб. При транспортировке пробы следует предохранять от замерзания, действия прямых солнечных лучей, резких толчков и т.д.

10. Аппаратура, оборудование, материалы, реактивы, коммерческие питательные среды, окраски бактерий по Граму, постановка оксидазного теста с реагентом - см. ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа".

11. Приготовление среды Эндо (модификация). Среду готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. В готовую и охлажденную до 60-70°C среду перед разливкой в чашки допускается для подавления роста посторонних бактерий, препятствующих получению на фильтрах изолированных колоний, прибавлять на 100 см<sup>3</sup> среды: 0,2 мл 10%-ного спиртового раствора основного фуксина, 0,4-0,5 см<sup>3</sup> 5%-ного водного раствора фенола и 1,8 см<sup>3</sup> этилового спирта. Затем среду разливают в чашки Петри по 15-20 см<sup>3</sup>. Если на поверхности среды заметны следы влаги, чашки перед посевом необходимо подсушить, поместив их с приоткрытыми крышками в термостат. Срок хранения чашек

со средой не более 2-3 сут в темноте при температуре 4<sup>0</sup>C; добавок - не более 6 мес.

12. Подготовка мембран к работе. Из дна сосуда, в котором производят кипячение (химический стакан, эмалированная кастрюля и т.п.), помещают "сторож для молока" или нержавеющую сетку для ограничения бурного кипения. Дистиллиированную воду заливают в этот сосуд в небольшом объеме, ограничивающем свободное вращение в ней фильтрующих мембранны, но достаточном для того, чтобы предназначенные для стерилизации фильтрующие мембранны оказались при погружении покрытыми водой. Дистиллиированную воду доводят в сосуде до 80-90<sup>0</sup>C и убирают нагрев. После этого на поверхность воды по одной помещают фильтрующие мембранны, визуально проверившие на отсутствие трещин, отверстий, пузырей и т.д. Воду с помещенными в нее мембранными медленно доводят до кипения и кипятят на слабом огне в течение 10-15 мин. Затем эту воду сливают и заменяют небольшим количеством (чтобы покрыть фильтрующие мембранны) стерильной дистиллиированной воды. После этого фильтрующие мембранны готовы к употреблению. Повторное кипячение фильтрующих мембрани не требуется.

13. Подготовка фильтровального аппарата к анализу. Перед посевом пробы воды чайнику фильтровального аппарата стерилизуют фlamбированием после обтирания ватным тампоном, смоченным спиртом. После охлаждения в центр нижней части фильтровального аппарата (столика) фlamбированием пинцетом укладывают вверх рабочей поверхностью (более блестящей) стерильный мембранный фильтр, прижимают его верхней частью прибора (стаканом, воронкой) и закрепляют фиксирующим устройством, если оно предусмотрено конструкцией прибора.

14. Подготовка проб исследуемой воды к посеву. При выборе объемов посева или необходимого разведения анализируемых вод ориентируются на результаты предыдущих исследований и ориентировочную схему посева, приведенную ниже. Необходимо, чтобы при анализе не менее чем на двух мембранных виробки изолированные колонии, среди которых не более 10% новых ЛК (или БГК), если определяют этот показатель). При анализе воды

<u>Объект исследования</u>	<u>Объем засеваемой воды для определения коли-индекса</u>
Сточные воды: до очистки и обеззараживания после очистки	0,01-0,00001 или 0,001-0,00001 1-0,0001 или 1-0,0001
Сточные воды после очистки и обеззараживания: расбрасываемые в водоем утилизируемые	10-0,001 40, 10, 1 или 60, 30, 10 <sup>6</sup>
Водные объекты: в зоне выпуска сточных вод загрязняемые сточными вода-ми	1, 0,1, 0,01 или 0,1, 0,01, 0,001 10, 1, 0,1 или 1, 0,1, 0,01

\*Объем исследуемых проб может быть изменен в зависимости от интенсивности роста посторонних бактерий на фильтрах и величины коли-индекса, допускаемого соответствующим нормативом на утилизацию сточные воды.

неизвестного качества следует фильтровать не менее 3-4 десинтегратных объемов или разведений. Разведение следует готовить в объеме 10 мл. При необходимости допускается для подавления роста посторонних бактерий в подготовленные к анализу объемы или разведения проб непосредственно перед их посевом на мембранны вносить добавки из расчета на 10 мл пробы 0,2 мл 1%-ного спиртового раствора основного фуксина; 0,4 мл 0,5%-ного водного раствора фенола; 0,18 мл этилового спирта. Раствор фуксина и фенола готовят, разводя в 10 раз их растворы, приготовленные для внесения в среду Эндо. Контакт проб с добавками не должен превышать 10 мин.

15. Фильтрование воды. В верхнюю часть (стакан, воронку) подготовленного к работе фильтровального аппарата наливают точно отмеренный объем воды, затем создают вакуум в нижней части прибора. Для посева каждой пробы используют стерильный фильтровальный аппарат.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует фильтровать через один фильтровальный аппарат (без дополнительного фламбирования) сначала меньшие, затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры. Разведение оной пробы фильтруют через один фильтровальный аппарат (без дополнительного фламбирования), начиная с больших разведений; при фильтровании каждого последующего разведения меняют фильтры.

При фильтровании 1 см<sup>3</sup> исследуемой воды или ее разбавления в воронку следует предварительно налить 5-10 см<sup>3</sup> стерильного раствора для разбавлений, а затем внести анализируемую воду.

После окончания фильтрования воронку снимают, фильтрующую мембрану осторожно приподнимают за край фламбированым пинцетом при сохранении вакуума для тщательного удаления остатков воды из нижней стороны фильтра (подсушкивания), а затем переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая передвижения мембранны по поверхности среды, 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, даты посева, номера пробы. На одну чашку можно поместить 4-5 мембран с условием, чтобы они не соприкасались.

Если исследуемая вода содержит большое количество взвешенных веществ, то ее фильтруют сначала через предварительный мембранный фильтр для удаления крупной взвеси, который помещают в фильтровальный прибор, накладывая на фильтр для бактериологического анализа. После окончания фильтрования оба фильтра переносят на плотную питательную среду (раздельно) и при вычислении результатов анализа учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

16. Проведение анализа. Выбранные и подготовленные к анализу объемы воды фильтруют через мембранны Владипор марок МФА-МА № 5, 6, 7 или 8. Хорошо подсушенные мембранны помещают на среду Эндо, ставят в термостат ячейкавверх, инкубируют

при температуре  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 18-28 ч, после чего приступают к учету результатов.

17. Учет результатов при определении ЛКП. К учету приступают через 18-24 ч при наличии на мембранных фильтрах колоний, характерных для ЛКП (темно-красные и красные, с металлическим блеском и без него, розовые с красным центром, розовые слизистые крупные выпуклые, дающие красные или темно-красные отпечатки на обратной стороне фильтра). Если на фильтрах нет роста или имеются нехарактерные для ЛКП колонии (плеччатые, губчатые, с исровыми краями и поверхностью, пlesenевые и т.д.), к учету результатов приступают через 24 ч, дают отрицательный ответ: ЛКП отсутствуют в анализируемом объеме.

Если рост ЛКП обнаружен, подсчет их количества производят на тех фильтрах, где выросли изолированные колонии и число колоний, характерных для ЛКП, не более 30. Допустимо вести учет на фильтрах с числом колоний более 30 или по одному фильтру, но с обязательной оговоркой об этом в приложении к протоколу анализа.

В соответствующих случаях (см. п. 6) анализ завершается на этом этапе, производится вычисление индекса ЛКП.

При необходимости идентификации бактерий (см. п. 6) после подсчета количества колоний, характерных для ЛКП, выполняют оксидазный тест с СИБ-оксидазой (п. 21) или с реактивом по ГОСТ 18963-73 "Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа" или путем накапливания в соответствии с "Методическими указаниями по санитарно-микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов" (утверждены приказом Минздрава ССР № 2285-81 от 19.01.81). Все колонии, которые полностью или частично (ободок) приобрели сине-фиолетовую окраску, исключают из учета. Подсчитывают количество характерных для ЛКП колоний, окраска которых не меняется. Если дальнейшая идентификация не требуется, вычисляют индекс ЛКП.

Если необходимо продолжение исследования (см. п. 6), по 2-3 изолированных колонии каждого типа из числа оксидазо-

отрицательных характеристиках для ЛКП колоний подвергают дальнейшей идентификации: готовят мазки для исследования по Граму\* и одновременно делают посев в неитонную воду с СИБ-лактозой (гл. 4) или в полужидкую среду с лактозой. Посев необходимо сделать как можно быстрее, не позднее 5 мин после проявления оксидазной реакции, так как реагент для оксидазного теста обладает бактерицидностью. Учитывают колонии, которые ферментируют лактозу до кислоты и газа. Подсчитывают сумму колоний таких типов. Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то для вычисления количества лактозоположительных колоний этого типа в данном объеме используют формулу  $a \cdot c / B$ , где  $a$  – общее число колоний данного типа;  $B$  – число проверенных из них;  $c$  – число проверенных колоний с положительным результатом. Вычисляют индекс ЛКП.

Для вычисления индекса ЛКП (количество ЛКП в 1 дм<sup>3</sup> воды) суммируют количество колоний ЛКП и делят на объем воды, профильтрованной через эти фильтры, выраженный в кубических дециметрах.

При отсутствии на фильтрах колоний кишечных палочек индекс ЛКП будет меньше той величины, которая была бы определена в случае обнаружения в анализируемом объеме одной колонии кишечной палочки, например, при посеве 1 мл не выросло ни одной колонии. Индекс ЛКП будет менее 1000, он вычисляется следующим образом:

$$I \text{ кол.} : 0,001 \text{ дм}^3 = 1000 \text{ или } (I \text{ кол.} \times 1000 \text{ см}^3) : 1 \text{ см}^3 = 1000.$$

Если колонии выросли на одном из нескольких фильтров, то в расчет принимают объем воды, профильтрованный через все фильтры. Например, если при посеве 1, 10, 40 см<sup>3</sup> воды на 3 фильтра на одном из них выросло 3 колонии ЛКП, на двух дру-

\*Нечеткие результаты окраски по Граму могут быть уточнены: исследуемую культуру суспензируют в капле 3%-ного раствора KOH на предметном стекле. Если бактерии грамотриципательны, жидкость в капле становится вязкой, ее бактериологической петлей тянутся нити не 0,5–2 см. Учет более удобен на темном фоне.

тих роста нет, то индекс ЛКИ равен 3 кол.:  $0,051 \text{ дм}^3 = 58$  или (3 кол.  $\times 1000 \text{ см}^3$ ):  $51 \text{ см}^3 = 58$ . Если при посеве 1 и  $10 \text{ см}^3$  воды на одном фильтре выросла 1 колония ЛКИ, на другом - 5 колоний, то индекс ЛКИ равен (1+5 кол.):  $0,011 \text{ дм}^3 = 545$  или (6 кол.  $\times 1000 \text{ см}^3$ ):  $11 \text{ см}^3 = 545$ .

В случаях, когда на одном или нескольких фильтрах получен сплошной рост бактерий и подсчет колоний невозможен, в расчет принимают объем воды, профильтрованный через фильтры, на которых удалось провести учет. Например, если при посеве  $10 \text{ см}^3$  сплошной рост, а при посеве 1  $\text{cm}^3$  - 12 ЛКИ, то индекс ЛКИ равен 12 кол.:  $0,001 \text{ дм}^3 = 12000 = 1,2 \cdot 10^4$  или ( $12 \times 1000 \text{ см}^3$ ):  $1 \text{ см}^3 = 12000 = 1,2 \cdot 10^4$ .

18. Учет результатов при определении БГКИ. К учету приступают при отсутствии роста колоний через 24-28 ч, при наличии колоний, характерных для БГКИ, через 18-24 ч.

При отсутствии каких-либо колоний на фильтрах или при росте нехарактерных для исключительных палочек колоний (плейчатых, губчатых, с неровными краями или поверхностью, плесневых и т.д.) дают отрицательный ответ на присутствие БГКИ в анализируемом объеме.

При наличии на фильтрах колоний, характерных для БГКИ (темно-красных с металлическим блеском и без него, красных, розовых с красным центром, розовых, бесцветных и др.) выполняют оксидазный тест с помощью СИБ-оксидазы (п. 21) или с реагентом. Положительная реакция (синий цвет колонии или ее краев) всех колоний позволяет дать отрицательный ответ.

При наличии на мембранных фильтрах колоний, характерных для БГКИ с отрицательным оксидазным тестом, подсчитывают раздельно число колоний каждого типа. Темно-красные с металлическим блеском и без него (лактозоположительные) колонии с четким отпечатком на обратной стороне фильтра, оксидазоотрицательные исследуют по Граму\*. Убедившись в том, что эти колонии образованы грамотрицательными палочками, их относят к

\* Возможен уточняющий тест с ИОН (см. п. 17).

БГИ без подтверждающего этапа. Эти колонии проявляют на способность ферментировать глюкозу только в арбитризных и сомнительных случаях.

Если на фильтре выросли только такие лактозоположительные колонии, то их количество подсчитывают и дают положительный ответ на наличие БГИ в исследуемом объеме воды.

При наличии на фильтрах колоний других типов (израсных, розовых, бесцветных) для подтверждения их принадлежности к БГИ берут по 2-3 изолированных колонии каждого типа, покрывают мазки с последующей окраской по Граму и одновременно делают посев в пептонную воду с СИБ-глюкозой (гл. 5) или на полуядовую среду с глюкозой. Посев необходимо делать как можно быстрее, не позднее 5 мин после проявления оксидазной реакции, так как реагент для оксидазного теста обладает бактерицидностью.

В тех случаях, когда при выборочной проверке колоний одного какого-либо типа получены неодинаковые результаты, количество БГИ среди колоний этого типа в исследованном объеме воды вычисляют по формуле  $a \cdot c / B$ , где  $a$  - общее число колоний данного типа;  $B$  - число проверенных из них;  $c$  - число колоний, ферментирующих глюкозу до кислоты и газа.

Количество БГИ на фильтре определяют по сумме лактозоположительных колоний и колоний других типов, образованных грамотрицательными оксидазоположительными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа при температуре  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

Результат анализа выражают индексом БГИ (количество БГИ в 1 дм<sup>3</sup> воды). Для подсчета индекса число колоний БГИ, подсчитанных на фильтрах, делят на объем профильтрованной чистой воды, выраженный в кубических сантиметрах (подобно тому, как вычисляют индекс ЛП).

## 2. Мембранные фильтровальные аппараты

Подготовка, проведение и учет анализа коли-индекса сточной воды методом мембранных фильтров без фильтровального аппарата.

аппарата в основном соответствует описанному в гл. I. Исключение составляют п. I3 (не требуется подготовка фильтровального аппарата) и п. I5 (фильтрование воды проводится иначе). Дополнительные сведения приводятся ниже.

19. Подготовка фильтрующих подложек. Несколько слоев (8-10) фильтровальной бумаги (марка "розовая лента", "белая лента" или другая, быстро впитывающая воду фильтровальная бумага) с площадью большей, чем площадь фильтрующей мембраны, заворачивают в оберточную бумагу или укладывают в чашки Петри. Затем их стерилизуют автоклавированием при температуре  $120 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $10^6$  Па) 1 ч или сухим жаром при температуре  $160^\circ\text{C}$  в течение 1-2 ч. При необходимости можно стерилизовать только 1-2 верхних слоя фильтровальной бумаги.

20. Фильтрование воды. Простерилзованные кипячением мембранные фильтры укладывают вверх рабочей поверхностью (более блестящей) на 8-10 слоев фильтровальной бумаги (1-2 верхних слоя обязательно предварительно простерилзовани). Пинцеткой накапывают равномерно на поверхность мембраны отдельные порции предназначенного для исследования объема воды (не более 5 мл), не допуская ее растекания за пределы фильтрующей мембраны. Нужно быть особенно внимательными и не спешить при фильтрации первых капель пробы. Когда мембрана хорошо "прилипнет" к подложке из фильтровальной бумаги, процесс фильтрации ускорится и накапливать пробу на мембрану можно чаще.

Для посева каждой пробы используют стерильные подложки из фильтровальной бумаги.

При посеве нескольких объемов одной пробы следует на одной подложке фильтровать сначала меньшие, а затем большие объемы воды, меняя каждый раз мембранны. При исследовании разведенной одной пробы их фильтруют на одной подложке, начиная с больших разведений, каждый раз меняя фильтры.

Закончив фильтрование, дождавшись удаления влаги с мембранны, ее перекладывают, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, избегая передвижения мембранны по поверхности среды, пузырьков воздуха между средой и

фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней *бактериями* должна быть обращена вверх. Под каждым фильтром на дно чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, даты посева, номера пробы. На одну чашку можно поместить 4-5 мембран с условием, чтобы они не соприкасались.

#### 14. ПРИМЕНЕНИЕ СИБ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛКП И БГК

##### 3. Определение оксидазной активности бактерий

21. Постановка оксидазного теста при выделении *бактерий* методом мембранных фильтров. Мембранный фильтр с выросшими на нем изолированными колониями переносят пинцетом, не переворачивая, на чистую чашку Петри для СИБ-оксидазы, предварительно смоченный небольшим количеством ( $0,5-0,8 \text{ см}^3$ ) дистиллированной воды. Все иссиняющие колонии, а также колонии с сильным ободком не относятся к семейству *Enterobacteriaceae*, их не учитывают. Мембранный фильтр сразу же после четкого проявления реакции возвращают на среду Эндо, быстро подсчитывают оксидазоотрицательные колонии (не изменившие цвета), имеющие морфологию, характерную для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. При необходимости дальнейшего исследования немедленно (не позднее 5 мин) пересевают оксидазоотрицательные колонии по 2-3 колонии каждого типа для определения ферментации лактозы или глюкозы.

22. Постановка оксидазного теста при выделении *бактерий* бродильным (титрационным) методом или прямым посевом. По 2-3 изолированные колонии каждого типа, выросшие на секторах чашки со средой Эндо, частично снимают петлей и наносят шпричком на помещенный в чистую чашку Петри диск СИБ-оксидазы, предварительно смоченный небольшим количеством ( $0,5-0,8 \text{ см}^3$ ) дистиллированной воды. Оставшуюся часть колонии используют для изучения ферментации лактозы или глюкозы. При положительной оксидазной реакции в месте нанесения культуры бумага синеет в течение 1-2 мин; при отрицательной реакции ее цвет не меняется. Подсчитывают на секторах чашки со средой Эндо

исполнении только тех типов, которые оказались оксидазоотрицательными и имеют морфологию, характерную для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

В некоторых случаях оксидазный тест бактерий, выросших на среде Эндо, проявляется недостаточно четко, особенно при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет. В таких случаях нужно пересеять колонии со среды Эндо на питательный agar, после подращивания в течение 3–5 ч при температуре  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  пробу на оксидазную активность повторить.

#### 4. Определение ферментации лактозы

В пробирки с 1 мл 0,5%-ной центронной воды (или питательного флюклона), имеющей pH 7,4–7,8, предварительно подогретой до температуры  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  и с небольшим кусочком ваты, заносят штетлей изучаемую колонию (или часть ее) с мембранным фильтром или со среды Эндо, профламбированным пинцетом определяют диск СИБ-лактозы. Среда в пробирке приобретает красный цвет. Посевы инкубируют при температуре  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . При ферментации лактозы с образованием кислоты и газа среда приобретает желтый или оранжевый цвет, а пузырьки газа скапливаются между волокнами ваты. В качестве контроля используют пробирки со средой и СИБ-лактозой без культуры. В сравнении с окраской среды в этих пробирках оценивают окраску среды в опытных пробирках.

Результаты учитывают в течение 1–5 ч. Скорость реакции зависит от посевной дозы и ферментативной активности бактерий. При образовании кислоты и газа результат считается положительным. При отсутствии кислоты и газа, а также при наличии только кислоты пробирки оставляют в термостате. Окончательный учет производят через 24 ч. Отсутствие в пробирках кислоты и газа, так же как и отсутствие только кислоты или только газа, через 24 ч позволяет дать окончательный отрицательный ответ, наличие кислоты и газа – положительный.

#### 5. Определение ферментации глюкозы

Ход исследования аналогичен изложенному в гл. 4, но вместо СИБ-лактозы используют СИБ-глюкозу.

Подп. в печ. 17. 04. 89г. Объем 1,25 л. Зэк. 502 Тираж 1.000  
Тип. ХОЗУ Миннефтехимпрома СССР