

**4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Санитарно-микробиологический
и санитарно-паразитологический анализ воды
поверхностных водных объектов**

**Методические указания
МУК 4.2.1884—04)**

1. Разработаны: НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина РАМН (Ю. А. Рахманин, А. Е. Недачин, Т. З. Артемова, Т. В. Доскина, Р. А. Дмитриева, Л. В. Иванова); ИМПигТМ им. Е. И. Марциновского ММА им. И. М. Сеченова (В. П. Сергиев, Г. И. Новосильцев, А. И. Чернышенко, В. И. Касьянов); Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Н. С. Кривопалова, Т. Н. Цыбина); НИИ коммунального водоснабжения и очистки воды (Н. А. Русанова); НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова (О. Е. Иванова, Т. П. Еремеева, В. Б. Конторович); Ростовским-на-Дону НИИ микробиологии и паразитологии Минздрава России (В. В. Алешня, П. В. Журавлев, С. В. Головина); кафедрой паразитологии, паразитарных и тропических болезней МПФ ППО ММА им. И. М. Сеченова (Н. А. Романенко, Е. А. Черникова, М. В. Солдатова, М. С. Ещенко); Федеральным научным центром гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (Г. М. Трухина); Центром госсанэпиднадзора в г. Москве (Н. И. Тимошенко, Е. Г. Белова); Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России (С. С. Перель, З. С. Середа); Курским государственным университетом (Н. А. Плехова, С. С. Пехова, Е. Л. Дмитриева, О. В. Ходзаева, Н. С. Малышева, М. К. Лунева, О. В. Емельянова, Н. А. Самофалова, Ю. Ф. Мелихов); Белгород-Днестровским центром госсанэпиднадзора (Т. Я. Погорельчук, В. А. Олейник); Тюменским НИИ краевой инфекционной патологии Минздрава России (Т. Ф. Степанова).

Использованы материалы ГУП «Мосводоканал» (Г. П. Кашкарова); Аналитического центра «РОСА» (В. Е. Ларин); Фирмы «Стайлаб» (А. В. Галкин); Центра госсанэпиднадзора Краснодарского края (Л. И. Щербина); Центра госсанэпиднадзора Тульской области (Т. А. Попова); Московского НИИ генетики (Н. Б. Бавыкина).

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 3 марта 2004 г.

3. Введены взамен МУ 2285—81 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов».

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Содержание

1. Область применения	51
2. Санитарно-микробиологические исследования	52
2.1. Отбор, хранение и транспортирование проб	52
2.2. Аппаратура, расходные материалы, реактивы, питательные среды	53
2.3. Подготовка посуды и материалов	60
2.4. Приготовление питательных сред и реактивов	60
2.5. Подготовка к анализу	67
2.6. Методика работы при использовании мембранных фильтров	67
2.7. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации	67
2.8. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом	71
2.9. Определение колифагов прямым методом	73
2.10. Определение патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae рода Salmonella	75
2.11. Определение кишечных вирусов	77
3. Санитарно-паразитологические исследования	80
3.1. Отбор, хранение и транспортирование проб	80
3.2. Методики санитарно-паразитологического исследования воды поверхностных водоемов	81
3.3. Флотационный метод исследования воды	81
3.4. Метод санитарно-паразитологического исследования воды с применением прозрачных аналитических трековых мембран	82
3.5. Методика санитарно-паразитологического исследования воды на наличие ооцист криптоспоридий	83
3.6. Идентификация выявленных возбудителей кишечных паразитарных болезней	86
3.7. Визуальная оценка вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших кишечника и яиц гельминтов	87
4. Библиографические данные	88
Приложения для микробиологических исследований	89
Приложение 1. Определение общего числа микроорганизмов, образующих колонии на питательном агаре	89
Приложение 2. Определение спор сульфитредуцирующих клостридий	92
Приложение 3. Определение Escherichia coli методом мембранной фильтрации	93
Приложение 4. Определение Escherichia coli титрационным методом	94
Приложение 5. Определение энтерококков методом мембранной фильтрации	95
Приложение 6. Определение энтерококков титрационным методом	97
Приложение 7. Метод определения числа стафилококков	99

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

<i>Приложение 8. Таблицы расчета наиболее вероятного числа микроорганизмов.....</i>	<i>100</i>
<i>Приложение 9. Схема посева воды из различных объектов при работе методом мембранных фильтров</i>	<i>105</i>
<i>Приложение 10. Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом</i>	<i>105</i>
<i>Приложение 11. Цисты патогенных кишечных простейших и яйца гельминтов, определяемые методикой санитарно-паразитологического исследования воды</i>	<i>106</i>
<i>Приложение 12. Яйца гельминтов, определяемые методикой санитарно-паразитологического исследования воды.....</i>	<i>107</i>
<i>Приложение 13. Схема выполнения методики использования прозрачных аналитических трековых мембран</i>	<i>108</i>

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра
здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко

3 марта 2004 г.

Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов

Методические указания
МУК 4.2.1884—04

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания по методам контроля (далее – *МУК*) устанавливают методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического контроля качества воды поверхностных водных объектов в пунктах питьевого, хозяйственно-бытового и рекреационного водопользования, а также у населенных мест в соответствии с СанПиН 2.1.5.980—00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод», СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

1.2. Методические указания предназначены для органов и учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы, обеспечивающих государственный санитарно-эпидемиологический надзор и контроль за качеством воды поверхностных водоемов, используемых или намечаемых к использованию в качестве источников централизованного водоснабжения, зон рекреации, а также могут быть использованы лабораториями организаций, осуществляющих производственный контроль.

1.3. Санитарно-микробиологический анализ воды подземных источников проводят в соответствии с МУК 4.2.1018—01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды».

1.4. Санитарно-микробиологический анализ воды действующих источников в черте населенных мест, зонах рекреации осуществляют по показателям СанПиН 2.1.5.980—00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»: общие и термотолерантные колиформные бактерии, колифаги, возбудители кишечных инфекций (сальмонеллы, энтеровирусы).

1.5. При выборе нового поверхностного источника централизованного питьевого водоснабжения, а также при решении вопроса о необходимости проведения оздоровительных мероприятий или закрытия зоны рекреации, анализ качества воды проводят по более широкому набору микробиологических показателей в соответствии с действующими

щими документами. Методы определения дополнительных показателей приведены в прилож. 1—10.

2. Санитарно-микробиологические исследования

2.1. Отбор, хранение и транспортирование проб

Отбор проб осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб» и ГОСТ Р 51593—2000 «Вода питьевая. Отбор проб».

Пробы для санитарно-микробиологического анализа отбирают в стерильные емкости.

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов.

Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги) или завинчивающимися крышками. Многоразовая посуда, в т. ч. пробки, должна выдерживать стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

Стерильные емкости открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду не следует.

После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность и не намокающей при транспортировании (ватные пробки не применять), и стерильным колпачком.

При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании.

Поверхностные пробы отбирают с глубины 10—15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. Придонные пробы отбирают в 30—50 см от дна. Отбор проб следует производить с использованием различных плавсредств, с мостов, помостов и т. п. в местах, где глубина водоемов не менее 0,5 м. Недопустимо производить отбор проб с берега.

Поверхностные пробы отбирают батометром с устройством для закрепления стерильных емкостей. Глубинные пробы отбирают специальным батометром, предназначенным для этих целей. Допускается использовать другие приспособления, установленные в приложении к ГОСТ Р 51592—00.

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. Руки перед отбором проб должны быть обеззаражены.

Для воды, содержащей токсичные металлы (бериллий, ртуть, кадмий, таллий) массовой концентрацией более 0,01 мг/л, в емкости до их стерилизации добавляют 0,3 мл 15 %-ного раствора нитрилотриуксусной кислоты на 500 мл пробы.

Отбор проб производит специалист после прохождения инструктажа по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа.

Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом отбора проб воды с указанием места, даты, времени забора, фамилии специалиста, отбравшего пробу, и другой информации (температуры воды, погодных условий).

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Объем пробы зависит от того, какие микроорганизмы должны быть определены, например, при анализе воды:

- на индикаторные микроорганизмы – не менее 500 мл;
- на индикаторные и патогенные бактерии (сальмонеллы) – 1,5 л.

Доставку проб воды осуществляют в контейнерах-холодильниках при температуре (4—10) °С. В холодный период года контейнеры снабжают термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. В лаборатории, если анализ по каким-либо причинам откладывают, пробы следует поместить в холодильник.

При соблюдении указанной температуры транспортирования и хранения срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 ч. Если пробы нельзя охладить, их анализ проводят в течение 2 ч после забора.

Если не может быть соблюдено время доставки пробы и температура хранения, анализ пробы по бактериологическим показателям не проводят.

Метод отбора и концентрирования кишечных вирусов из воды поверхностных водоемов представлен в п. 2.11.

2.2. Аппаратура, расходные материалы, реактивы, питательные среды

2.2.1. Аппаратура

Термостаты для температурного режима
(37 ± 1) °С

Термостат и водяная баня с автоматическим
регулированием температуры (44 ± 0,5) °С

Водяная баня для температурного режима
(75 ± 5) °С

Водяная баня или термостат для температур-
ного режима 45—49 °С (для питательных сред)

Прибор для мембранной фильтрации под
вакуумом с диаметром фильтрующей поверх-
ности 35 или 47 мм и устройство для создания
разрежения 0,5—1,0 атм.

Весы лабораторные общего назначения 4 клас-
са точности, с пределом взвешивания до 1 000 г,
допустимая погрешность не более 0,1 г

ГОСТ 24104—80

Весы лабораторные общего назначения 4 класса
точности, с пределом взвешивания до 200 г,
допустимая погрешность не более 0,02 г

ГОСТ 24104—80

Весы торсионные с диапазоном измерений
от 0 до 500 мг

Термометр ртутный с диапазоном измерения
от 0 до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С

Термометр ртутный с диапазоном измерения
от 0 до 200 °С с ценой деления шкалы 1 °С

Термометр спиртовой с диапазоном измерения от -50 до $+50$ °С с ценой деления шкалы 1 °С	
РН-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью до $0,01$	ГОСТ 15150—69
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды не ниже	ГОСТ 6709—72
Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (180 ± 5) °С	
Стерилизатор паровой, режим работы от 0 до $2,5$ кгс/см ³	ГОСТ 17726—81
Холодильники бытовые электрические с температурой в камере $4—6$ °С	
Холодильник глубокого замораживания $(-20$ °С)*	
Вытяжной шкаф для работы с хлороформом при исследованиях на колифаги*	
Нагревательный прибор для варки питательных сред, либо магнитные мешалки с подогревом до 300 °С	
Прибор для счета колоний бактерий	
Лупа с двукратным увеличением	
Дозаторы для разлива жидких питательных сред и растворов	
Дозаторы пипеточные	
Облучатель бактерицидный	
Оптический стандарт мутности на 10 ед.	
Микроскоп стереоскопический, обеспечивающий увеличение от $3,5\times$ до $119\times$, с полем зрения $39—1,9$ мм	
Инвертированный микроскоп для просмотра флаконов с культурами клеток при анализе на энтеровирусы*	
Микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение от $84\times$ до $1350\times$	ГОСТ 8284—78
Батометр с устройством для закрепления стерильных емкостей	
Батометр специальный для отбора проб с разных глубин	
Часы сигнальные или песочные	ГОСТ 10576—74
Центрифуга лабораторная рефрижераторная ЦЛР-1МР*	ТУ-42-2145
Шуттель-аппарат*	

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Ламинарный шкаф для культуры клеток
(класс не ниже 2)*

Микродозаторы переменного объема: на 0,5—
10 мкл; 40—200 мкл; 200—1 000 мкл

Штатив для микродозаторов 5-поз.

Наконечники на 200, 1 000 мкл

Примечание.

1)* Аппаратура, используемая для вирусологического анализа.

2) Для экспресс анализа индикаторных и патогенных микроорганизмов в воде может использоваться микробиологический анализатор «БакТрак 4000» в соответствии с МУК 4.2.1111—02

2.2.2. Посуда лабораторная стеклянная

Пробирки (многоразового или одноразового
использования) ГОСТ 25336—82

Цилиндры, вместимостью 100, 250, 500 мл
или мензурки, вместимостью 250, 500, 1 000 мл ГОСТ 1770—74

Чашки бактериологические (Петри) ГОСТ 23932—90

Воронки стеклянные ГОСТ 25336—82

Пипетки, вместимостью 1, 2, 5, 10 мл с ценой
деления 0,1 мл (многоразового или одноразового
использования) ГОСТ 29227—91

Стекля предметные ГОСТ 9284—85

Стекля покровные ГОСТ 6672—85

Стеклянные бюретки, диаметром 12—13 мм
и высотой 35—40 см

Флаконы стеклянные или пластиковые (одно-
разовые) для культивирования культур тканей
емкостью: 5, 100, 200, 500 и 1 000 мл

2.2.3. Расходные материалы

Мембранные фильтры для микробиологических
целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и
размером диска 35 или 47 мм или другие фильтру-
ющие мембраны с аналогичной способностью
фильтрации, имеющие сертификат качества

Индикаторы бумажные для определения pH в
диапазоне 6—8 с интервалом определения 0,2

Фольга алюминиевая, колпачки металлические

Горелки газовые или спиртовки

Петли бактериологические

Поплавки бактериологические

Пинцеты для работы с мембранными фильтрами

Штативы для пробирок

Емкости эмалированные

Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием

ГОСТ 12026—76

Вата хлопковая медицинская гигроскопическая

ГОСТ 5556—81

Марля медицинская

ГОСТ 9412—77

Маркеры водостойкие

Лейкопластырь

Перчатки резиновые

Шпагат

Бумага плотная для упаковки посуды

Штативы комбинированные для пробирок 0,6 и 1,5 мл

Пленка Parafilm M

Штативы для культивирования клеток культур ткани в пробирках в статическом состоянии

Планшеты пластиковые для культивирования культур тканей

2.2.4. Химические реактивы

Железо серно-кислое закисное 7-водное

ГОСТ 4148—78

Бромтимоловый синий

ТУ 6-09-20-86—77

Кислота соляная

ГОСТ 3118—77

Натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) 5-водный

ГОСТ 27068—86

Натрий хлористый

ГОСТ 4233—77

Натрий гидрат окиси

ГОСТ 4328—77

Спирт этиловый ректификованный медицинский

ГОСТ 5962—67

Спирт этиловый технический

ГОСТ 18300—87

Глюкоза

ГОСТ 6038—79

Лактоза

ГОСТ 6038—74

Натрий сернисто-кислый (сульфит натрия)

ГОСТ 903—76

α -нафтол**

ГОСТ 5838—79

Розоловая кислота

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Фенилендиаминовые соединения:**

N,N,N',N',-тетраметил-п-фенилендиамин
гидрохлорид или N,N-диметил-п-фенилен-
диамин соляно-кислый

ТУ 6-09-1903—77

Фуксин основной**

ТУ 6-09-4119—75

Хлороформ ***

ГОСТ 22300

Калий фосфорно-кислый однозамещенный

ГОСТ 4198—75

Калий фосфорно-кислый двузамещенный

ГОСТ 2493—75

Кислота серная

ГОСТ 4204—77

Натрий двууглекислый

ГОСТ 2156—76

Натрий углекислый

ГОСТ 83—79

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный
безводный

ГОСТ 11773—76

Натрий фосфорно-кислый однозамещенный

ГОСТ 245—76

Фенол

ГОСТ 5417—72

Бриллиантовый зеленый

ТУ 6-09-4278—76

Калий теллуристо-кислый

ТУ 6-09-2060—77

Кислота ортофосфорная

ТУ 6-09-4229—76

Магний хлористый 6-водный

ГОСТ 4209—77

Натрия азид

Перекись водорода 33 %

ГОСТ 10929—76

Пара-диметиламинобензальдегид

ТУ 6-09-3272—77

2,-3,-5-трифенилтетразолий хлорид

ТУ 6-09-3838—78

Кальций углекислый

Йод кристаллический

Калий йодистый

Триптофан

Амиловый спирт

Фуксин кислый

Тетратионат калия

Кристаллический фиолетовый водорастворимый

Трис (Tris (hydroxymethyl) aminomethone) М. в 121,
Sigma Т 1378*

Бифэкстракт (сухой) Sigma В-4888*

Макропористое стекло – МПС 1000 ВГХ

Нейтральный красный*

Примечание.

Все химические реактивы должны соответствовать квалификации не ниже ЧДА

* Вещества, используемые для вирусологического анализа.

** Вещества обладают канцерогенным и мутагенным действием, работа с ними требует соблюдения мер предосторожности.

*** Вещества, используемые для исследований на колифаги и энтеровирусы

2.2.5. Питательные среды

Питательная среда для выделения
энтеробактерий, сухая (типа Эндо)

Агар микробиологический

ГОСТ 17206—84

Агар питательный сухой

ТУ 42-14-33—75

Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой
или среда Гисса с лактозой

Сухой препарат с индикатором ВР и глюкозой
или среда Гисса с глюкозой

Сухой питательный бульон

Пептон сухой ферментативный для бактериоло-
гических целей

ГОСТ 13805—76

Системы индикаторные бумажные (СИБ)

-СИБ-лактоза

-СИБ-оксидаза

-СИБ-глюкоза

Питательная среда для накопления сальмонелл,
сухая (селенитовый бульон)

Питательная среда для выделения энтерококков,
сухая

Питательная среда для выделения стафилококков,
сухая

Агар с эозин-метиленовым синим, сухой (среда
Левина)

Висмут-сульфит агар

SS-агар

Питательная среда для первичной идентификации
энтеробактерий (агар Клиглера)

Сыворотки агглютинирующие адсорбированные
сальмонеллезные О и Н (сухие)

Сыворотки агглютинирующие адсорбированные
поливалентные к сальмонеллам

Яйца куриные диетические

Молоко обезжиренное

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Антибиотики: бензилпенициллин натриевая соль, сульфат стрептомицина*

Раствор Эрла 10-кратный 5860-68*

Раствор Версена*

Раствор Хенкса, pH 7.2*

Среда Игла-МЭМ с двойным набором аминокислот*

Сыворотка эмбриональная*

Раствор трипсина 0,25 %*

Перевиваемые линии клеток RD, BGM, Нер-2*

Набор диагностических сывороток для типирования вирусов*

Примечание.

* Реактивы и питательные среды для вирусологического анализа.

Допускаются к использованию оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации с аналогичными характеристиками, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке.

Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29 000.

При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Все обезвоженные питательные среды должны иметь сертификат соответствия.

2.2.6. Тест-культуры микроорганизмов

Контрольный колифаг MS-2 штамм ВКПМ РН 1505, штамм ВКПМ-3254 *E. coli* K₁₂ F⁺ Str-r, штамм *Escherichia coli* 675, *Staphylococcus aureus* 906 и один из штаммов: *Pseudomonas aeruginosa* 10145 ATCC или *Pseudomonas fluorescens* 948 ATCC.

Штаммы получают во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (Государственном НИИ генетики) и (или) в Национальном органе контроля (Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича).

Примечание. В производственных лабораториях, расположенных на территории водопроводных станций, следует использовать штамм *Pseudomonas fluorescens* (температура инкубации культуры 25—28 °С).

2.2.7. Внутренний контроль качества микробиологических исследований

Комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий роста микроорганизмов, ведения эталонных бактериальных культур, а также предупреждения неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе выполнения анализа и оценки его результатов, изложены в МУ 2.1.4.1057—01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологического исследования воды».

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

2.4.2.2 Пептонный раствор

В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$. Разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ 20 мин. Разливают мерно непосредственно перед посевом.

Срок хранения – до 1 месяца при комнатной температуре.

2.4.2.3 Пептонный солевой раствор

В 1 л дистиллированной воды растворяют при кипячении 8,5 г хлорида натрия и 1 г пептона. Устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$. Стерилизуют при температуре $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ 20 мин. Разливают мерно непосредственно перед посевом.

Срок хранения – до 1 месяца при комнатной температуре.

2.4.3. Питательный бульон

Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.

Питательный бульон (десятикратный) для колифагов готовят путем увеличения в 10 раз навески сухого препарата, указанной на этикетке.

2.4.4. Питательный агар

Готовят из сухого препарата промышленного производства по способу, указанному на этикетке.

Питательный агар не допускается выдерживать в расплавленном состоянии более 8 ч. Оставшийся неиспользованным агар повторному расплавлению не подлежит.

Питательный агар для определения колифагов прямым методом при посеве 20 мл пробы на чашку Петри готовят, увеличивая навеску сухого препарата в 2 раза от прописи. Разливают в емкости, автоклавируют при температуре $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ 20 мин.

Полужидкий питательный агар готовят с использованием одной трети навески сухого препарата, указанной на этикетке. Разливают в пробирки и автоклавируют при температуре $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$ 20 мин.

Питательный агар со стрептомицином готовят из расчета содержания 100 мкг стрептомицина на 1 мл питательного агара, приготовленного по стандартной прописи. Стерильно на стерильной дистиллированной воде готовят раствор стрептомицина в концентрации 10 мг на 1 мл. В готовый питательный агар, отмеренный по объему и остуженный до температуры $45\text{—}49^\circ\text{C}$, вносят приготовленный стерильный раствор стрептомицина из расчета 0,1 мл на 10 мл питательного агара. Разливают в пробирки для приготовления скошенного агара. Срок хранения питательного агара со стрептомицином не более 2 недель. Повторное расплавление питательной среды со стрептомицином запрещается.

2.4.5. Фуксин-сульфитная среда Эндо

Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке.

Готовую среду охлаждают до $60\text{—}70^\circ\text{C}$ и разливают в чашки Петри.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Допускается использовать сухой препарат промышленного производства (стафилококкагар).

2.4.17. Среда Мюллера-Кауфмана

В 500 мл исследуемой воды вносят 25 мл 10 %-ного пептона, 0,5 г желчных солей, 5 г кальция углекислого, 15 г натрия тиосульфата, 0,5 мл 0,1 %-ного 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.

2.4.18. Приготовление желчной соли по Олькеницкому

К 1 000 мл желчи крупного рогатого скота прибавляют 40 г натрия гидрата окиси, гидролизуют в автоклаве при 120 °С 3 ч или 2 раза по 2 ч в посуде, исключая алюминиевую. После охлаждения в гидролизат прибавляют 100 мл 20 %-ного водного раствора бария хлористого и прогревают в автоклаве при 100 °С 1 ч. Через 18—24 ч отстаивания сливают жидкость с осадка и фильтруют. К профильтрованному гидролизату прибавляют при постоянном помешивании 20 %-ный раствор соляной кислоты до кислой реакции (рН 6,4—6,6) и оставляют на 18—24 ч. Надосадочную жидкость сливают, осадок промывают водой, прибавляют при нагревании 40 %-ный раствор натрия гидрата окиси до слабо щелочной реакции (рН 7,2—7,4) и выливают на противень для подсушивания в сушильном шкафу при 115 °С до порошкообразного состояния. Из 1 000 мл желчи можно получить 36 г смеси желчных солей. Следует остерегаться перещелачивания при последней операции. Хранят соли в темной банке с притертой пробкой.

2.4.19. Селенитовая среда Лейфсона

Готовят из сухого препарата промышленного производства по указанию на этикетке.

Для приготовления селенитового бульона двойной концентрации увеличивают навеску сухого препарата в два раза на тот же объем дистиллированной воды.

2.4.20. Магниева среда

Приготовление 100 мл среды обычной и двойной концентрации.

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

Растворы	Ингредиенты	Обычная концентрация	Удвоенная концентрация
А	Пептон ферментативный	0,42 г	0,84 г
	Натрий хлористый	0,7 г	1,4 г
	Калий фосфорно-кислый 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	Бриллиантовый зеленый 0,1 %-ный водный раствор	0,5 мл	1,0 мл

Определение *Escherichia coli* титрационным методом

Если в посевах в среде накопления обнаружен газ, а при высеве на среду Эндо выросли темно-красные колонии с металлическим блеском, то одновременно подтверждают наличие ТКБ и *E. coli*, для чего по 2—3 типичные колонии с каждого сектора засевают параллельно в две пробирки: с лактозной средой по п. 2.4.7 и со средой, содержащей триптофан (п. 2.4.25) для установления способности ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С и продуцировать индол.

Посев производят в среды, прогретые до температуры 44—45 °С, немедленно переносят в термостат и инкубируют при температуре $(44 \pm 0,5)$ °С в течение 24 ч.

Продукцию индола определяют одним из общепринятых методов – с помощью индикаторных бумажек (п. 2.4.24) или с реактивом Ковача (п. 2.4.26). Положительный ответ дают при наличии кислоты и газа в лактозной среде и при образовании индола.

Вместо среды, содержащей триптофан, можно сделать посев в лактозный бульон с борной кислотой (п. 2.4.8), соблюдая описанные выше условия посева и инкубации. Положительный ответ на наличие в среде накопления *E. coli* дают при помутнении и образовании газа. При использовании этой среды индол не определяют.

При необходимости подтвердить наличие энтерококков по 2—3 колонии каждого типа:

- микроскопируют после окраски по Граму (МУК 4.2.1018—01) и при обнаружении в мазках грамположительных, как правило, слегка вытянутых с заостренными концами диплококков, дают положительный ответ;
- пересевают секторами на солевой агар с ТТХ (п. 2.4.15) и после 24—48 ч инкубации посевов при температуре 37 °С энтерококки на среде дают равномерный нежный рост на протяжении всего штриха. Иные бактерии на этой подтверждающей среде не растут;
- выполняют каталазный тест, нанося петлей культуру на предметное стекло. После подсушивания на воздухе добавляют каплю свежеприготовленной 3 %-ной перекиси водорода, прикрывают покровным стеклом. При отсутствии пузырьков газа – каталазоотрицательный тест. Контрольная каталазоположительная культура – любой вид стафилококков.

5.4. Учет результатов

Подсчитывают число колоний энтерококков на фильтрах, где выросло менее 50—70 колоний, суммируют и определяют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{V}, \text{ где}$$

- X – число КОЕ энтерококков в 100 мл исследуемой воды;
 a – число подсчитанных энтерококков в сумме;
 V – объем воды, профильтрованной через фильтры, на которых велся учет.

В протоколе исследования выдают «число КОЕ энтерококков в 100 мл».

(37 ± 1) °С. Из посевов, где имеет место помутнение, независимо от наличия или отсутствия газа, делают высев на сектора азидной среды. При высеве из среды накопления необходимо часть среды сверху осторожно, не взбалтывая, удалить пипеткой, оставшуюся часть размешать и троекратно нанести материал бактериологической петлей диаметром 2—3 мм на поверхность плотной азидной среды п. 2.4.14. Посев производят штрихом, к концу которого должны быть получены изолированные колонии. Молочно-ингибиторную среду и энтерококкагар при выполнении этого метода не применять.

При необходимости подтвердить наличие энтерококков на секторах делают микроскопию окрашенных по Граму мазков, пересевают на подтверждающую среду и определяют каталазную активность в соответствии с п. 5.3. Определяют НВЧ энтерококков в 100 мл по соответствующим полученным результатам таблиц прилож. 8.

**Таблицы расчета
наиболее вероятного числа микроорганизмов**

Таблица 8.1

**Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 100 мл воды
поверхностных водоемов, обеззараженных сточных вод**

Число положительных объемов			НВЧ бактерий в 100 мл
двух объемов по 1,0 мл	двух объемов по 0,1 мл	двух объемов по 0,01	
1	2	3	4
0	0	0	менее 50
0	0	1	50
0	0	2	90
0	1	0	50
0	1	1	90
0	1	2	140
0	2	0	90
0	2	1	140
0	2	2	190
1	0	0	60
1	0	1	120
1	0	2	190
1	1	0	130
1	1	1	200
1	1	2	280
1	2	0	210
1	2	1	290
1	2	2	370
2	0	0	230

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Продолжение табл. 8.2

1	2	3	4	5	6	7	8
0	1	0	30	2	1	0	150
0	1	1	61*	2	1	1	200
0	1	2	92*	2	1	2	270*
0	1	3	120*	2	1	3	340*
0	2	0	62*	2	2	0	210
0	2	1	93*	2	2	1	280
0	2	2	120*	2	2	2	350*
0	2	3	160	2	2	3	420*
0	3	0	94*	2	3	0	290
0	3	1	130*	2	3	1	360*
0	3	2	160*	2	3	2	440*
0	3	3	190*	2	3	3	530*
1	0	0	36	3	0	0	230
1	0	1	72	3	0	1	390
1	0	2	110*	3	0	2	640
1	0	3	150*	3	0	3	950*
1	1	0	73	3	1	0	430
1	1	1	110	3	1	1	750
1	1	2	150*	3	1	2	1 200
1	1	3	190*	3	1	3	1 600*
1	2	0	110	3	2	0	930
1	2	1	150*	3	2	1	1 500
1	2	2	200*	3	2	2	2 100
1	2	3	240*	3	2	3	2 900
1	3	0	160*	3	3	0	2 400
1	3	1	200*	3	3	1	4 600
1	3	2	240*	3	3	2	11 000
1	3	3	290*	3	3	3	более 11 000

Примечание.

1) * Вероятность ниже допустимого уровня.

2) Схему посева табл. 8.2 используют при необходимости получения более точных результатов.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Таблица 8.3

**Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 100 мл воды
незагрязненных водоемов**

Число положительных результатов из			НВЧ бактерий в 100 мл
одного объема по 50 мл	пяти объемов по 10 мл	пяти объемов по 1 мл	
1	2	3	4
1	2	3	4
0	0	0	менее 1
0	0	1	1
0	0	2	2
0	1	0	1
0	1	1	2
0	1	2	3
0	2	0	2
0	2	1	3
0	2	2	4
0	3	0	3
0	3	1	5
0	4	0	5
1	0	0	1
1	0	1	3
1	0	2	4
1	0	3	6
1	2	3	4
1	1	0	3
1	1	1	5
1	1	2	7

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Продолжение табл. 8.3

1	2	3	4
1	1	3	5
1	2	0	5
1	2	1	7
1	2	2	10
1	2	3	12
1	3	0	8
1	3	1	11
1	3	2	14
1	3	3	8
1	3	4	21
1	4	0	13
1	4	1	17
1	4	2	22
1	4	3	28
1	4	4	35
1	4	5	43
1	5	0	24
1	5	1	35
1	5	2	54
1	5	3	92
1	5	4	160
1	5	5	более 240

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Приложение 9 (справочное)

Схема посева воды из различных объектов при работе методом мембранных фильтров

Объект исследования	Объем засеваемой воды (мл) для определения	
	колиформных бактерий	энтерококков
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	100; 50; 10; 1	100; 50; 10
Водоемы, загрязняемые сточными водами	10; 1; 0,1; 0,01	10; 1; 0,1
Водоемы в зоне влияния выпуска сточных вод	0,1; 0,01; 0,001; 0,0001	1; 0,1; 0,01

Приложение 10 (справочное)

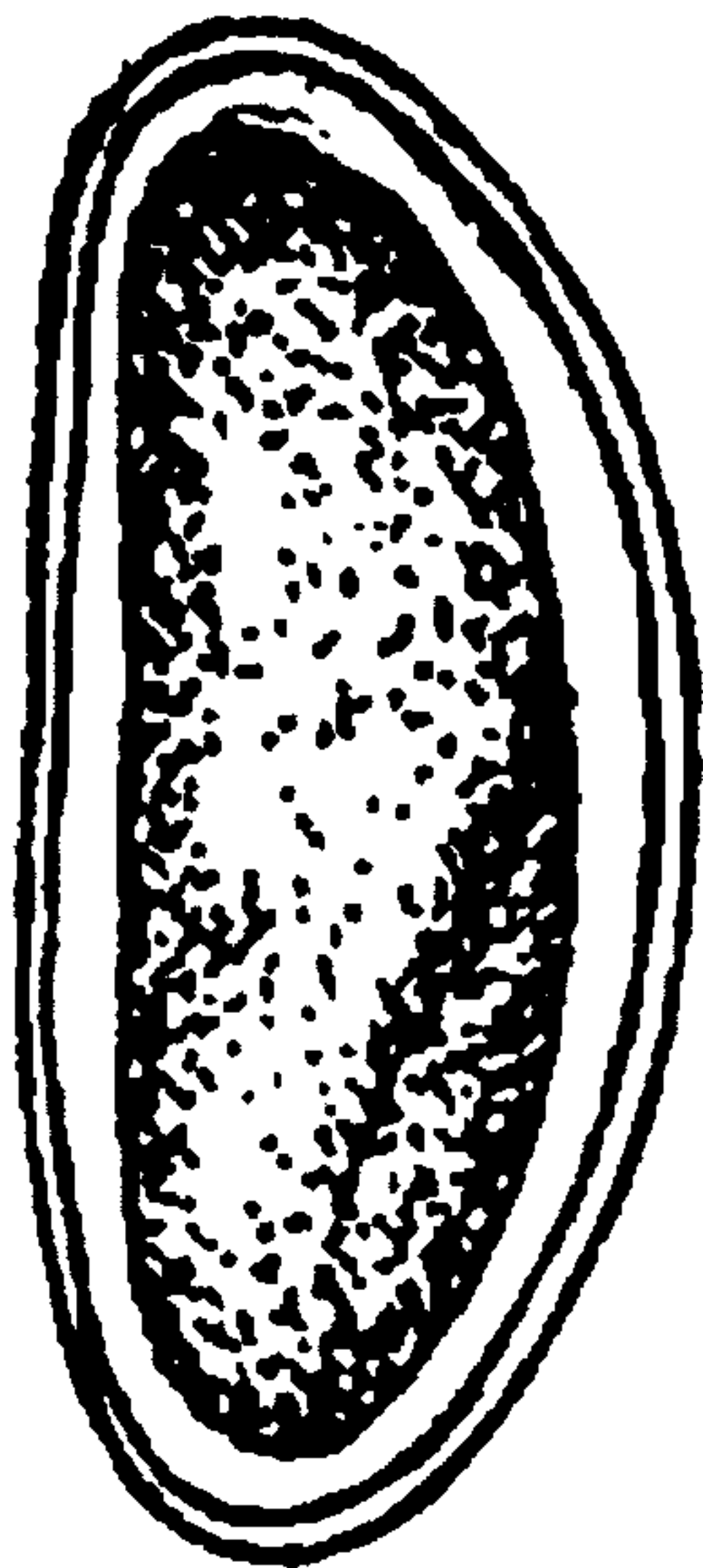
Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом

Объект исследования	Объем засеваемой воды (мл) для определения	
	колиформных бактерий	энтерококков
Водоемы, не загрязняемые сточными водами	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1	50; 5 повторностей по: 10; 1
	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1; 0,01	2 или 3 повторности по: 100; 10; 1; 0,1
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 или 3 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.

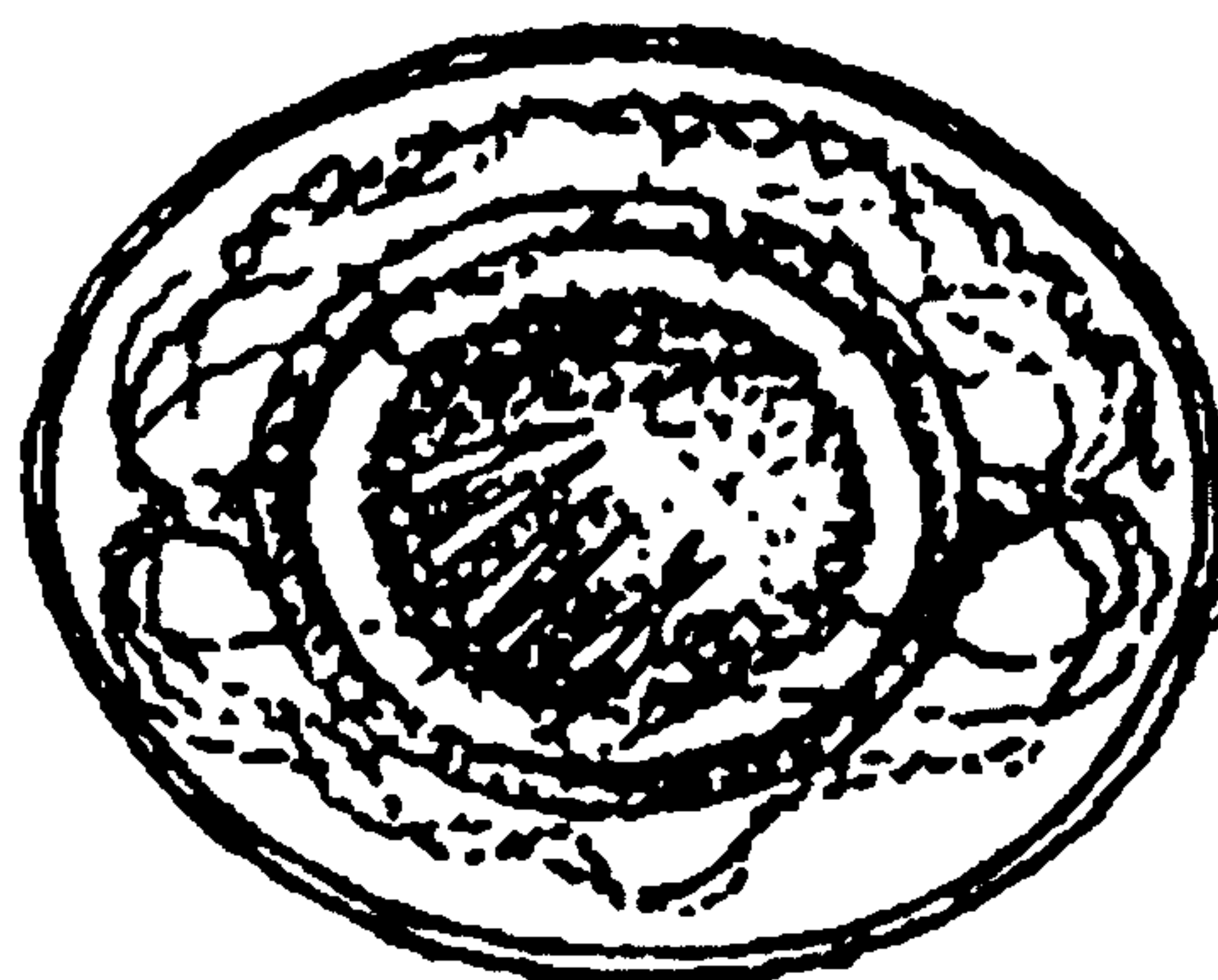
**Яйца гельминтов, определяемые методикой
санитарно-паразитологического исследования воды**



Яйцо острицы

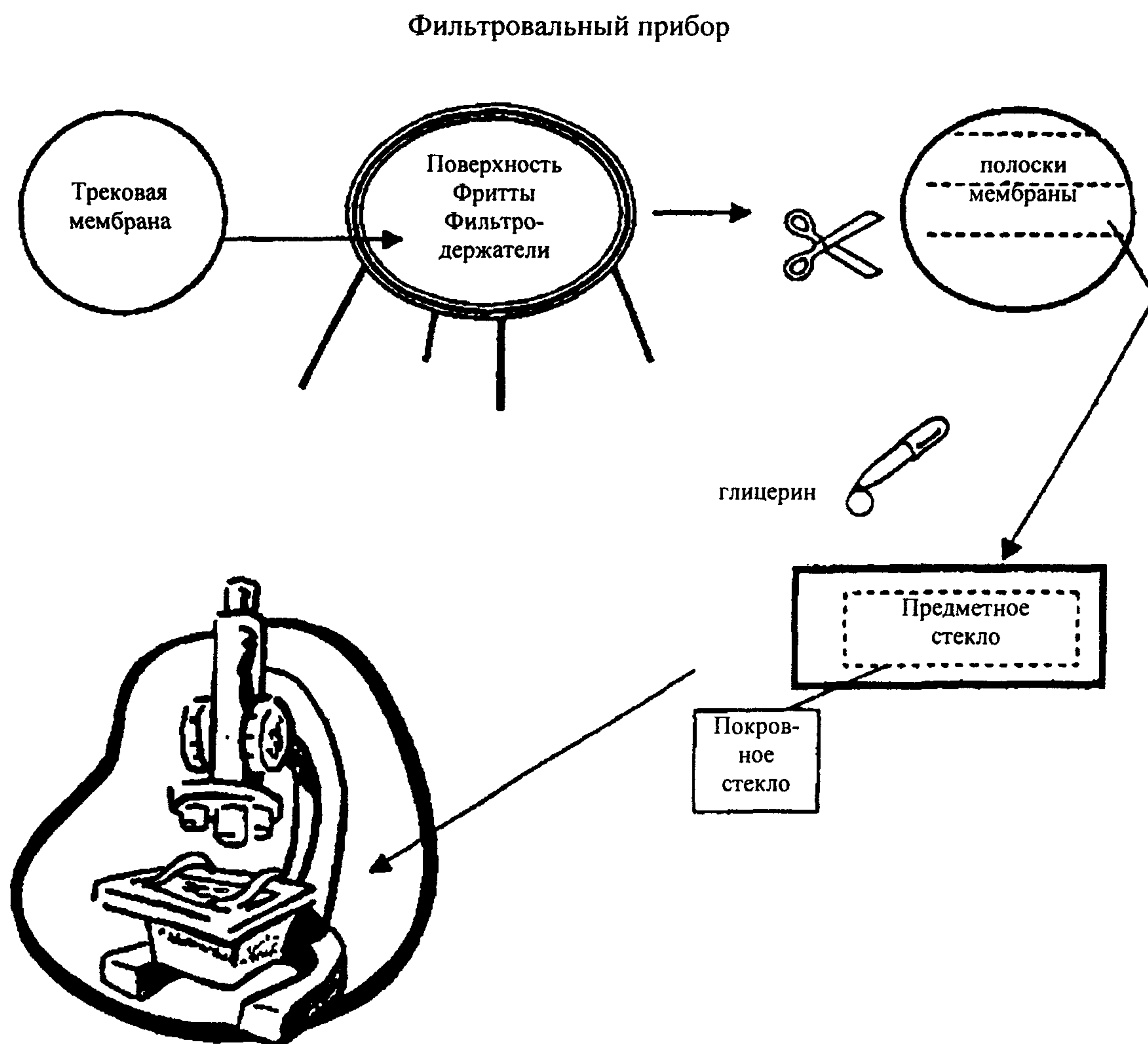


Онкосфера тенид



Яйцо цепня карликового

**Схема выполнения методики использования прозрачных
аналитических трековых мембран**



Микроскопия готового препарата трековой мембраны
на предметном стекле под покровным стеклом
(объектив 10х: окуляр 10х, 40х)