

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
19 марта 2010 г.
Регистрационный № 070-0210

**МЕТОДЫ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
ВОДЫ ПЛАВАТЕЛЬНЫХ БАССЕЙНОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.П. Филонов, канд. мед. наук
И.А. Застенская, канд. биол. наук Л.А. Мельникова, Н.В. Дудчик,
Т.С. Трешкова, В.В. Трейлиб, О.Е. Шедикова

Минск 2010

ГЛАВА 1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Методы санитарно-микробиологического контроля воды плавательных бассейнов» (далее — Инструкция) устанавливает методы санитарно-микробиологического контроля качества воды плавательных бассейнов в отношении ее эпидемиологической безопасности в соответствии с действующими Санитарными правилами и нормами 2.1.2.10-39-2002 «Санитарно-гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды плавательных бассейнов», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 167 от 31.12.02.

2. Настоящая Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций, контролирующих качество воды плавательных бассейнов.

3. Настоящая Инструкция должна учитываться при пересмотре действующей и разработке вновь создаваемой нормативной документации для контроля воды плавательных бассейнов.

ГЛАВА 2. ОТБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1. Отбор проб проводят специалисты, прошедшие инструктаж по технике выполнения отбора проб для микробиологического анализа.

2. Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкость многократного применения, оснащенную плотно закрывающейся пробкой и защитным колпачком, изготовленную из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов и выдерживающих стерилизацию сухим жаром или автоклавированием.

3. При отборе проб в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для микробиологических исследований.

4. При отборе воды после обеззараживания химическими реагентами для нейтрализации остаточного количества дезинфектанта в емкость, предназначенную для отбора проб, до стерилизации вносят серноватокислый натрий в виде кристаллов из расчета 10,0 мг на 500,0 мл воды.

5. Емкость открывают непосредственно перед отбором (пробку удаляют вместе со стерильным колпачком). Во время отбора пробка и края емкости не должны касаться окружающих предметов. Ополаскивать посуду запрещается.

6. Отбор проб из крана производят после предварительного обжигания и последующего спуска воды не менее 10 мин при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды может быть уменьшен.

Пробу отбирают непосредственно из крана, без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок.

Если через пробоотборный кран происходит постоянный излив воды, отбор проб производят без предварительного обжига, изменения напора воды

и существующей конструкции (не снимая силиконовые или резиновые шланги).

7. В ванне плавательного бассейна отбор проб воды на анализ производят не менее чем в двух точках в мелкой и глубокой частях ванны бассейна на глубине 25–30 см от поверхности зеркала воды в отдельную емкость. Перед исследованием готовят объединенную пробу из равных объемов воды.

8. При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды (пробка не должна смачиваться при транспортировании); после наполнения емкость закрывается стерильной пробкой (силиконовой, резиновой или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги).

9. Отобранную пробу маркируют и сопровождают документом с указанием места, даты, времени отбора, фамилии специалиста, отбравшего пробу и другой информации.

10. Доставку проб осуществляют в контейнерах-холодильниках при температуре +4–10 °С. При соблюдении указанного условия срок начала исследования от момента отбора не должен превышать 6 ч. Если пробы нельзя охладить, их анализ следует провести в течение 2 ч после отбора.

11. Перед посевом пробу тщательно перемешивают, край емкости фламбируют.

ГЛАВА 3. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

1. Оборудование	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)
Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр)	ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках	ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $45 \pm 0,5$ °С	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000 г	ГОСТ 24104-2001
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-2001
Вытяжной шкаф для работы с хлороформом при проведении анализа на колифаги	
Дистиллятор электрический	
Лупа с пятикратным увеличением	ГОСТ 25706-83

Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000[×]

ГОСТ 8284-78

Облучатель бактерицидный

ТУ РБ 14790891.001-95

Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разряжения 0,5–1,0 атм

Прибор для счета колоний бактерий

ТУ 64-1-2041-72

Стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см²)

«Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением»,

утвержденные приказом-постановлением

Министерства по чрезвычайным ситуациям

Республики Беларусь и

Министерства труда

Республики Беларусь

№ 33/45 от 30.04.98

ГОСТ 24437-89

Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры 100–220 °С

Термометр 0–50 °С, цена деления 0,5 °С

ГОСТ 13646-68

Термометр 0–200 °С, цена деления 1,0 °С

ГОСТ 13646-68

Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±0,5 °С

Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1,0 °С

Холодильник бытовой

ГОСТ 16317-87

Часы сигнальные или песочные

Электроплитка бытовая

ГОСТ 14919-83

2. Материалы

Бумага индикаторная универсальная

ТУ 6-091181-76

Бумага плотная для упаковки посуды

ГОСТ 12026-76

Вата медицинская гигроскопичная

ГОСТ 5556-81

Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости

ГОСТ 25336-82

Марля медицинская

ГОСТ 9412-93

Маркеры водостойкие

Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие мембранные фильтры с аналогичной способностью фильтрации	
Ножницы	ГОСТ 21241-89
Оптический стандарт мутности на 10 единиц	
Петли бактериологические, в т. ч. платиновые	
Пинцеты для работы с мембранными фильтрами	
Пипетки вместимостью 1, 5, 10 мл с ценой деления 0,1 мл (много- или одноразового использования)	ГОСТ 29227-91
Поплавки бактериологические	
Пробирки бактериологические	ГОСТ 25336-82
Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие температуру стерилизации	
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932- 90
Стекла предметные	ГОСТ 9284-75
Цилиндры на 100–250 мл	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 мл	ГОСТ 10782-85
Стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135-2004 ГСИ
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки Петри 90–100 мм	ГОСТ 25336-82
3. Питательные среды и реактивы	
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
Агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов	ФС 42-188ВС-90
Агар Байрд-Паркер	
Агар Клиглера	
Агар мясопептонный	
Агар с цетримидом	
Агар Эндо	ФС 42-186ВС-88
Аргинин	
Бромтимоловый синий	
Бульон питательный сухой	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Глицерин	ГОСТ 6824-96
Глицин	
Дифференцирующая среда для псевдомонад	
Калий серноокислый	ГОСТ 4145-74

Калий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 4198-75
Калия нитрат	ГОСТ 4217-77
Калия гидроокись	
Калия теллурид, раствор с массовой концентрацией 10 г/л	
Кислота розоловая	
Кислоты соляной раствор с концентрацией 0,1 моль/л	ГОСТ 3118-77
Лактоза	ГОСТ 6038-74
Магний сернокислый	
Магний хлористый	ГОСТ 4209-77
Малахитовый зеленый, индикатор	ГФ РБ Т. 1.
Маннит	ГОСТ 8321-74
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164-78
Масло иммерсионное	ГОСТ 13739-78
Молоко обезжиренное	
Натрия гидроокись, раствор с концентрацией 0,1 моль/л	ГОСТ 4238-77
Натрий лимонно-кислый трехзамещенный	
Натрий-аммоний фосфорнокислый	
Натрия пируват с массовой концентрацией 200 г/л	
Натрий серновато-кислый	
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77
N,N-диметил-п-фенилендиамин гидрохлорид	
α-нафтол	ГОСТ 5838-79
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805-76
Плазма кролика, сухая цитратная для реакции плазмокоагуляции	
Растворы и реактивы для окраски мазков по Граму	ГОСТ 10444.1-84; ГОСТ 18963-73
Системы индикаторные бумажные (далее — СИБ):	
СИБ-лактоза	
СИБ-оксидаза	
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-67
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300-87
Среда Гиса с маннитом (мальтозой)	
Среда Хью-Лейфсона	
Сухой препарат с индикатором ВР и лактозой или среда Гисса с лактозой	
Трифенил тетразолий хлорид	
Феноловый красный, индикатор	ГФ РБ Т. 1.
Фуксин основной	

Хлороформ

Яйцо куриное диетическое

4. Штаммы микроорганизмов

Контрольный колифаг MS2, штамм ВКПМ

3254 *E.coli* K 12 F⁺

Штамм *Staphylococcus aureus*, обладающий

ферментом коагулазой, полученный из

государственных коллекций

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для исследований в соответствии с настоящей Инструкцией. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в порядке, установленном законодательством Республики Беларусь.

ГЛАВА 4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

1. Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно Методическим указаниям «Санитарно-микробиологический анализ воды питьевой» № 11-10-1-2002, утвержденным Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 25.02.02.

2. Предпочтительно использование стандартизированных сухих питательных сред промышленного производства. Промышленные сухие питательные среды готовят в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке.

3. Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации не ниже «чистый для анализа» (далее — ч.д.а.). Питательные среды готовят в посуде из инертного материала.

4. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия в массовой концентрации 0,1 моль/л или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/л; рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги. Учитывая возможное изменение рН питательных сред после кипячения и стерилизации, окончательный контроль рН проводят в

готовой среде при температуре 25 °С с использованием индикаторной бумаги.

5. После стерилизации питательные среды оставляют для охлаждения при комнатной температуре. При необходимости розлива в чашки Петри среды охлаждают до 50–60 °С. Температура сред, хранящихся в холодильнике, перед посевом должна быть доведена до комнатной.

6. Приготовление питательных сред

Фуксин-сульфитная среда Эндо

Готовят из сухого препарата по способу, указанному на этикетке. Если на поверхности среды заметны следы влаги, то чашки перед посевом подсушивают. Срок хранения чашек со средой не более 2–3 сут в темноте, если производителем не оговорены другие сроки.

Для повышения дифференцирующих свойств среды в готовую и охлажденную до 60–70 °С среду перед розливом в чашки прибавляют на 100 мл среды 0,2 мл 5%-го спиртового раствора основного фуксина. Срок хранения раствора фуксина — не более 1 мес.

В случаях, когда мембранные фильтры зарастают микрофлорой, не относящейся к бактериям кишечной группы, помимо фуксина добавляют на 100 мл среды Эндо 0,2 мл 5%-го спиртового раствора розоловой кислоты. Срок хранения раствора розоловой кислоты — не более 1 мес.

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

Лактозопептонная среда

Растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды 10 г пептона, 5,0 г натрия хлористого, 5,0 г лактозы. После растворения ингредиентов устанавливают рН 7,4–7,6, разливают по 10 мл в пробирки, стерилизуют при 112±2 °С 12 мин.

Для приготовления концентрированной лактозопептонной среды все ингредиенты, кроме воды, увеличивают в 10 раз, разливают по 1 мл в пробирки и по 10 мл во флаконы.

Питательный агар

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

Питательный агар для определения колифагов готовят прямым методом, увеличивая навеску сухого препарата в 2 раза от прописи.

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

Полужидкий питательный агар: 15 г сухого питательного бульона и 3 г агара микробиологического растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды. Доводят рН до 7,0–7,2, разливают в пробирки и стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин.

Питательный агар со стрептомицином готовят из расчета содержания 100 мкг стрептомицина на 1 мл питательного агара, приготовленного по стандартной прописи. Стерильно на стерильной дистиллированной воде

готовят раствор стрептомицина в концентрации 10 мг на 1 мл. В готовый питательный агар, отмеренный по объему и остуженный до температуры 45–49 °С, вносят приготовленный стерильный раствор стрептомицина из расчета 0,1 мл на 10 мл питательного агара. Разливают в пробирки для приготовления скошенного агара. Повторное расплавление питательной среды со стрептомицином запрещается.

Питательные среды для подтверждения способности ферментировать лактозу до кислоты и газа

Полужидкую среду с лактозой из сухого препарата готовят по способу, указанному на этикетке. Срок хранения — не более 2 недель при комнатной температуре. Посев производят уколом до дна пробирки. При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется в соответствии с использованным индикатором. При газообразовании газ скапливается, или по уколу, или на поверхности, или в толще среды появляются разрывы. При инкубации посевов более 5 ч газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды «карманы» — потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.

Жидкая лактозо-пептонная среда. Готовят с добавлением 1 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего на 1 л среды, разливают по 3–5 мл в пробирки с поплавком или комочком ваты.

СИБ-лактоза. Используют по инструкции изготовителя.

При выборе среды для подтверждения ферментации углеводов целесообразно использовать полужидкие среды, которые позволяют улавливать небольшое количество газа и на ранних стадиях ферментации, что повышает чувствительность метода и скорость получения ответа через 4–6 ч.

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.

Желточно-солевой агар

1 л мясо-пептонного агара перед анализом расплавляют и растворяют в нем 95 г хлористого натрия, охлаждают до температуры 45 ± 1 °С и добавляют 100 мл яично-желточной эмульсии. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 5 сут.

Эмульсия яично-желточная: куриное яйцо протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, помещают в стерильную чашку Петри, стерильным инструментом пробивают с противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно отверстие полностью удаляют белок, затем, увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу с 50 мл физиологического раствора, содержимое встряхивают до однородной массы. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 72 ч.

2Агар Байрд-Паркер

К 90 мл основы среды добавляют асептически 5 мл яично-желточной эмульсии (см. выше «желточно-солевой агар») и стерилизованные фильтрованием через мембранный фильтр растворы: 6,3 мл раствора глицина концентрации 200 г/л, 5 мл раствора пирувата натрия концентрации 200 г/л и 1 мл раствора теллурида калия концентрации 10 г/л. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 48 ч.

Маннитно-солевой агар

В 1 л дистиллированной воды вносят 10 г пептона ферментативного сухого, 75 г натрия хлористого, 10 г маннита. Все ингредиенты растворяют в воде, затем вносят 2,5 мл 1%-го раствора фенолового красного, тщательно перемешивают, устанавливают рН $7,6 \pm 0,2$, кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар микробиологический, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при 121 ± 1 °С в течение 15 мин. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 14 сут.

Среда Гисса с маннитом и мальтозой

Готовят из сухого препарата промышленного производства в соответствии с указаниями на этикетке.

*Среды для обогащения бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa**

Среда Бонде концентрированная (10-кратная):

В колбу вносят 2,8 г натрия лимоннокислого трехзамещенного, 1,5 г натрий-аммония фосфорнокислого, 1,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 0,2 г магния сернокислого. Все ингредиенты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при перемешивании и нагревании, устанавливают рН $7,3 \pm 0,2$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при 121 ± 1 °С в течение 20 мин.

Хранят при температуре +4...–10 °С не более 14 сут.

*Селективно-дифференциальные среды для идентификации бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa**

Среда Кинг-А:

В 1 л дистиллированной воды вносят 20 г пептона ферментативного сухого, 5 г магния хлористого, 1 г калия сернокислого. Все ингредиенты растворяют в воде и оставляют на 15 мин. Затем вносят 10 мл глицерина, тщательно перемешивают, растворяют при нагревании, устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$, кипятят в течение 1 мин, прибавляют агар микробиологический, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при 121 ± 1 °С в течение 20 мин.

Хранят при температуре +4...–10 °С не более 14 сут.

Среда Блеск:

100 мл стерильного питательного агара, приготовленного из сухого препарата по прописи на этикетке, расплавляют на водяной бане. После охлаждения до температуры приблизительно 50 °С добавляют 0,3 г аргинина, 8 мл 10%-го водного раствора трифенилтетразолий хлорида, 10 мл стерильного обезжиренного теплого молока, тщательно перемешивают и

разливают в чашки по 25 мл. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 14 сут.

Агар с цетримидом готовят из сухого препарата промышленного производства в соответствии с указаниями на этикетке, также как и дифференцирующую среду для псевдомонад.

Нитратная среда

В 1 л дистиллированной воды вносят 5 г пептона ферментативного сухого, 5 г натрия хлористого, 1,5 г калия нитрата, растворяют при перемешивании и нагревании, устанавливают рН 7,2±0,2, кипятят в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 4–5 мл и стерилизуют при 121±1 °С в течение 20 мин. Хранят при температуре +4...–10 °С не более 14 сут.

Агар Клиглера

Готовят из сухого препарата промышленного производства в соответствии с указаниями на этикетке.

Среда Хью-Лейфсона

Готовят из сухого препарата промышленного производства в соответствии с указаниями на этикетке.

7. Приготовление растворов и реактивов

Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор). 0,85 г хлористого натрия: растворяют в 100 мл дистиллированной воды и стерилизуют при 121±1 °С в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

Раствор фенолового красного в массовой концентрации 1%: 0,1 г фенолового красного растирают, добавляя небольшими порциями 2,82 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл 96% спирта. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Хранят во флаконе из темного стекла в холодильнике при температуре +4...–10 °С в течение 7 сут.

Реактивы для проведения оксидазного теста:

Вариант 1: 1%-й водный раствор тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида. Готовят перед употреблением.

Вариант 2. Реактив № 1: 1%-й спиртовой раствор α-нафтола; реактив № 2: 1%-й водный раствор фенилендиаминового соединения.

Растворы сохраняют в темных флаконах с притертыми пробками: первый — до 1 мес., второй — до 1 недели. Перед употреблением к 3 частям первого раствора добавляют 7 частей второго раствора.

Могут быть использованы коммерческие тест-системы для постановки оксидазного теста (СИБ-оксидаза или аналоги).

ГЛАВА 5. МЕТОДИКА РАБОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

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

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

3. В воронку прибора для фильтрования наливают отмеренный объем воды, затем создают вакуум.

4. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают; фильтрование проб начинают с обеззараженной воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтруют загрязненные пробы.

5. После окончания фильтрования и осушения фильтра вакуум отключают, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят на питательную среду в чашку Петри так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Поверхность фильтра с оставшимися на ней бактериями должна быть обращена вверх. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева; на одну чашку — 3–4 фильтра с условием, чтобы они не соприкасались.

ГЛАВА 6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранной фильтрации.

Сущность метода

Метод основан на фильтрации установленного объема воды через мембранный фильтр, выращивании посевов на дифференциальной питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

К общим колиформным бактериям (далее — ОКБ) относят грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч.

К термотолерантным колиформным бактериям (далее — ТКБ) относят бактерии, обладающие признаками общих колиформных бактерий, а также способные ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре $44\pm 0,5$ °С в течение 24 ± 2 ч.

Выполнение анализа

Для исследования воды плавательных бассейнов анализируют объем воды 100 мл.

Отмеренный объем воды фильтруют через мембранный фильтр с соблюдением требований главы 5 настоящей Инструкции. Фильтр помещают на среду Эндо, чашку с фильтром ставят в термостат, посев инкубируют при 37 ± 1 °С в течение 24 ± 2 ч.

Если на фильтре нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, расплывчатые, то выдают отрицательный ответ: «отсутствие ОКБ и ТКБ в 100 мл».

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний с отпечатком на оборотной стороне фильтра, необходимо их подтверждение для отнесения к ОКБ и ТКБ.

Для подтверждения наличия ОКБ исследуют все колонии, если на фильтрах выросло менее 5 колоний или не менее 3–4 колоний каждого типа.

Для подтверждения наличия ТКБ исследуют все типичные колонии, но не менее 10.

Каждую выбранную изолированную колонию исследуют на наличие оксидазной активности и определяют грампринадлежность (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Грегерсена), также проверяют способность культуры ферментировать лактозу до кислоты и газа.

Постановка оксидазного теста

Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2–3 каплями реактива для оксидазного теста. Готовые бумажные системы смачивают дистиллированной водой. Часть изолированных колоний стеклянной палочкой или платиновой петлей наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин появляется фиолетово-коричневое (вариант 1) или синее (вариант 2) окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. При положительном результате эту колонию из дальнейшего исследования исключают.

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

Если на части или на всей поверхности фильтра наблюдается наложение колоний или сплошной рост, выполняют оксидазный тест путем помещения мембранного фильтра на кружок фильтровальной бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом, или на диск СИБ-оксидаза, смоченный дистиллированной водой. При появлении первых признаков реакции, но не более чем через 5 мин, мембранный фильтр переносят обратно на среду Эндо. После четкого проявления реакции определяют результат. При появлении фиолетово-коричневого или синего окрашивания (в зависимости от применяемого реактива) оксидазный тест считают положительным. Если все колонии на фильтре оксидазоположительные или не подтвердилась их принадлежность к ОКБ и ТКБ, анализ завершают, отмечают «зарост фильтров». В обоих случаях анализ повторяют.

При отрицательной оксидазной реакции делают рассев для получения изолированных колоний и подтверждают их принадлежность к ОКБ и ТКБ по соответствующим пунктам настоящей Инструкции.

Определение грам-принадлежности

Из оксидазоотрицательной колонии делают мазок и окрашивают по Граму. На обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют по поверхности стекла. Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки. На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциана фиолетового, через 0,5–1 мин бумагу снимают. Наливают раствор Люголя на 0,5–1 мин, затем сливают его и промывают стекло этиловым спиртом, пока не перестанет отходить краситель. Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1–2 мин раствором фуксина или сафранина. Стекло промывают и просушивают фильтровальной бумагой. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные — сине-фиолетовую. Колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Окраска по Граму может быть заменена тестом Греггерсена. В капле 3%-го водного раствора гидроокиси калия на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлей взвесь ослизняется. Если за петлей тянутся слизистые нити, то это указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются — реакция отрицательная.

Определение ферментации лактозы

Оставшуюся часть оксидазоотрицательной грамотрицательной изолированной колонии засевают параллельно в две пробирки с лактозной средой. Для подтверждения наличия ОКБ посев инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ч. Для подтверждения наличия ТКБ посев осуществляют в среду, предварительно подогретую до 43–44 °С, и инкубируют при температуре $44\pm 0,5$ °С в течение 24 ч.

Первичный учет образования кислоты и газа на подтверждающих полужидких средах и СИБ возможен через 4–6 ч. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами для окончательного учета ТКБ оставляют до 24 ч. Пробирки с посевами для подтверждения наличия ОКБ после просмотра через 24 ч и получения отрицательного результата оставляют для окончательного учета до 48 ч.

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

Обработка и выражение результатов

Грамотрицательные колонии учитывают как ОКБ при отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при 37 ± 1 °С с образованием кислоты и газа.

Грамотрицательные колонии учитывают как ТКБ в отрицательном оксидазном тесте и ферментации лактозы при $44\pm 0,5$ °C с образованием кислоты и газа.

При отсутствии общих и термотолерантных колиформных бактерий на всех фильтрах выдают ответ «не обнаружено ОКБ в 100 мл» и «не обнаружено ТКБ в 100 мл».

Ориентировочный результат может быть выдан при обнаружении типичных колиформных колоний на среде Эндо, образованных грамотрицательными оксидазоотрицательными бактериями. Окончательный ответ подтверждают по результатам теста ферментации лактозы. При наложении колоний или сплошном росте на всех фильтрах в случае подтверждения принадлежности к ОКБ и ТКБ выдают качественный ответ «обнаружены в 100 мл».

2. Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

Сущность метода

Метод основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциальную плотную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам. Титрационный метод может быть использован в случае отсутствия материалов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации, при исследовании воды с большим содержанием взвешенных веществ, в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиформных бактерий.

Проведение анализа

При исследовании воды плавательных бассейнов пробу воды в объеме 100 мл засевают в 10 мл концентрированной лактозо-пептонной среды. Посевы инкубируют при 37 ± 1 °C в течение 48 ч. Не ранее 24 ч инкубации проводят предварительную оценку. Из емкости, в которой отмечено наличие роста (помутнение) и образование газа, производят высеv бактериологической петлей на среду Эндо для получения изолированных колоний.

Емкости, в которых отсутствует рост и образование газа, оставляют в термостате и окончательно просматривают через 48 ч. Посевы без признаков роста считают отрицательными и исключают из дальнейших исследований.

Посевы на среде Эндо инкубируют при 37 ± 1 °C в течение 18–20 ч. В случае помутнения с образованием газа в среде накопления и росте на среде Эндо типичных колоний лактозоположительных бактерий (темно-красных или красных, с металлическим блеском или без него, выпуклых с красным центром и отпечатком на питательной среде) выдают положительный ответ о присутствии общих колиформных бактерий в данном объеме пробы.

Наличие ОКБ требуется подтвердить, если в среде накопления отмечено только помутнение, а также, если принадлежность к лактозоположительным колониям вызывает сомнение.

В этих случаях проверяют наличие отпечатка на среде Эндо после снятия петлей подозрительной колонии, проводят оксидазный тест, определяют грампринадлежность исследуемых колоний, проверяют способность к газообразованию при посеве изолированных 1–2 колоний каждого типа на среду с лактозой с последующей инкубацией посевов при температуре при 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч.

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

Отрицательный ответ выдают в следующих случаях: если в среде накопления нет признаков роста; на секторах среды Эндо нет роста; на секторах среды Эндо выросли не характерные для колиформных бактерий колонии (прозрачные, с неровными колониями, расплывчатые и т. п.); все колонии оказались оксидазоположительными; все колонии оказались грамположительными; если в подтверждающем тесте на среде с лактозой не отмечено газообразования.

Для определения термотолерантных бактерий работают с посевами на секторах среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии. Делают посев 2–3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с лактозными средами.

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

При образовании газа в среде накопления, росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 24 ч при 44 °С выдают положительный ответ о наличии ТКБ в объеме исследуемой воды. Во всех остальных случаях ответ отрицательный.

Для ускорения выдачи ответа на присутствие ТКБ допускается производить высев по 1 мл из сред накопления, где отмечено помутнение и газообразование, в пробирку с лактозо-пептонной средой с поплавками, прогретой до 44 °С. Посевы выдерживают в термостате при температуре $44\pm 0,5$ °С в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ.

Обработка и выражение результатов

Результаты оценивают качественно. При обнаружении ОКБ и ТКБ выдают ответ: «обнаружены в 100 мл», при отсутствии ОКБ и ТКБ — «не обнаружены в 100 мл».

3. Определение колифагов титрационным методом

Сущность метода

Определение колифагов в воде плавательных бассейнов заключается в предварительном накоплении колифагов в среде обогащения на культуре *Escherichia coli* (далее — *E. coli*) K12 Stm^R на питательном агаре.

Колифаги — бактериальные вирусы, способные лизировать *E. coli* и формировать зоны лизиса бактериального газона (бляшки) на питательном агаре при температуре 37 ± 1 °С через 18 ± 2 ч.

Подготовка тест-культуры E. coli K12 Stm^R

На всех этапах исследования используют бактериальную взвесь, приготовленную следующим образом: культуру *E. coli* засевают в пробирку со скошенным питательным агаром со стрептомицином. Через 18 ± 2 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С производят смыв бактерий с косяка 5 мл стерильного физиологического раствора и по стандарту мутности на 10 единиц готовят взвесь *E. coli* в концентрации 10^9 бактериальных клеток в 1 мл.

Допускается использование 4-часовой бульонной культуры *E. coli*, полученной путем культивирования в термостате при температуре 37 °С. Концентрация 10^9 бактериальных клеток *E. coli* содержится в 2 мл.

Качественный анализ

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

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

Исследуемую пробу воды (100 мл) и чашку Петри с контролем *E. coli* помещают в термостат и инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 18 ± 2 ч.

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

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

В предварительно расплавленный и остуженный до 45–49 °С питательный агар добавляют приготовленный смыв бактерий *E. coli* из расчета 1 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара.

В стерильную чашку Петри пипеткой из пробирки переносят 1 мл обработанной хлороформом пробы (не касаясь хлороформа) и заливают смесью расплавленного и остуженного до 45–49 °С питательного агара объемом 12–15 мл, осторожно покачивают для равномерного перемешивания пробы воды и агара. Дополнительно ставят чашку Петри для контроля культуры *E. coli* на лизогенность. Для полного застывания чашки оставляют на столе при комнатной температуре на 10 мин. После застывания переворачивают и помещают в термостат на 18 ± 2 ч при 37 °С.

При выполнении серии проб ставится общий контроль для всей серии. Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. Проба считается положительной при наличии полного лизиса, просветления нескольких

бляшек, одной бляшки на чашке с пробой воды при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

При обнаружении колифагов выдают ответ: «колифаги обнаружены в 100 мл», при отсутствии — «колифаги не обнаружены в 100 мл». При наличии зон лизиса в контроле культуры анализ прекращают, результат считается недействительным. В этом случае анализ повторяют.

Количественный анализ

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

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

Посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 18 ± 2 ч.

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

В предварительно расплавленный и остуженный до 45–49 °С питательный агар добавляют приготовленный смыв бактерий *E. coli* из расчета 1 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на 100 мл агара. Приготовленную смесь разливают в чашки Петри: одну чашку для контроля культуры *E. coli* на лизогенность и по одной чашке на каждую исследуемую пробу воды. При одновременном анализе нескольких проб воды ставят один контроль культуры *E. coli*.

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

После подсыхания капель чашки с исследуемыми пробами и контрольную чашку помещают в термостат при 37 ± 1 °С на 18 ± 2 ч.

Просмотр результатов осуществляется в проходящем свете.

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

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

Пробу считают положительной при наличии зоны лизиса хотя бы на одном секторе при отсутствии зон лизиса на контрольной чашке.

Оценку проводят по таблице наиболее вероятного числа (далее — НВЧ) бляшкообразующих единиц (далее — БОЕ) (приложение). Указывают наиболее вероятное количество колифагов в 100 мл воды и диапазон возможных колебаний: «НВЧ БОЕ (нижний предел – верхний предел) в 100 мл». Результат полуколичественный.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результаты считают недействительными.

4. Определение колифагов прямым методом

Сущность метода

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

Прямой метод выделения колифагов из воды проводят параллельно с титрационным при исследованиях по эпидемическим показаниям.

Проведение анализа

В питательный агар двойной концентрации, расплавленный и остуженный до 45–49 °С, добавляют смыв *E. coli* из расчета 1 мл смыва (или 2 мл 4-часовой бульонной культуры) на каждые 100 мл агара, перемешивают. Исследуемые 100 мл воды разливают по 20 мл в большие пробирки, нагревают до 35–44 °С и немедленно (не более чем через 5 мин по достижении требуемой температуры) разливают в 5 чашек Петри и сразу же вносят в каждую чашку по 20 мл смеси агара с культурой *E. coli*.

Для контроля культуры *E. coli* в одну чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды, предварительно прогретой до 35–44 °С, заливают 20 мл приготовленного агара с *E. coli* и осторожно перемешивают.

Содержимое чашек оставляют при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром помещают дном вверх в термостат и инкубируют при температуре 37±1 °С в течение 18±2 ч.

Обработка и выражение результатов

Просмотр посевов осуществляется в проходящем свете.

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

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

При высоких концентрациях фага наблюдают разную картину лизиса.

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

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

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

Окончательный количественный учет прямого посева проводят через 18 ± 2 ч. Результаты выражают количеством БОЕ на 100 мл пробы воды.

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

При получении отрицательного результата (работа прямым методом) окончательный ответ выдают по данным титрационного метода.

При наличии зон лизиса в контрольной чашке результаты исследования считают недействительными. В этом случае анализ повторяют.

5. Постановка контролей

Отрицательный контроль

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

Отрицательным контролем служит исследование стерильной водопроводной воды, проводимое аналогично анализируемой пробе воды. Так, при анализе воды титрационным методом 10 мл стерильной водопроводной воды вносят в дополнительную пробирку. При анализе воды прямым посевом в дополнительную шестую чашку Петри вносят 20 мл стерильной водопроводной воды.

Дополнительные посевы исследуют в отношении колифагов аналогично основным пробам.

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

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

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

Методика подтверждения фаговой природы лизиса

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

С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара, подозрительный в отношении колифагов, помещают его в 5 мл питательного бульона, куда добавляют каплю тест-культуры *E. Coli*, и инкубируют при 37 °С в течение 16–18 ч. Полученную культуру обрабатывают хлороформом и выявляют наличие фага. Высев осуществляют петлей или пипеткой на сектора питательного агара. Лизис на любом из секторов расценивается как подтверждение фаговой природы лизиса.

6. Определение лецитиназоположительных стафилококков

При оценке качества воды плавательных бассейнов индикаторными считают стафилококки, обладающие лецитиназной активностью, в основном вида *Staphylococcus aureus* (далее — *S. aureus*). Определение бактерий вида *S. aureus* проводят прямым методом фильтрации воды или методом накопления.

Бактерии вида *S. aureus* представляют собой грамположительные кокки, обладающие лецитиназной активностью, сбраживающие маннит в аэробных и анаэробных условиях или мальтозу в анаэробных условиях, и дающие положительную реакцию плазмокоагуляции.

7. Определение S. aureus прямым методом

Сущность метода

Прямой метод основан на фильтровании установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на селективно-дифференциальных средах для культивирования стафилококков и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

Проведение анализа

Объем воды 100 мл фильтруют через мембранный фильтр. Фильтр помещают на плотные среды: желточно-солевой агар, агар Байрд-Паркер, маннитно-солевой агар. Чашку с фильтром ставят в термостат дном вверх, посев инкубируют при 37±1 °С в течение 24–48 ч. После 24 ч инкубации проводят предварительную оценку посевов; дальнейшая инкубация в течение 24 ч возможна при комнатной температуре.

Идентификация S. aureus

Если при использовании среды Байрд-Паркер на фильтре выросли колонии черного или темно-серого цвета диаметром 1–3 мм, окруженные двойной зоной протеолитической и липазной активности, то подтверждение принадлежности этих колоний к *S. aureus* устанавливать не обязательно.

Если при использовании желточно-солевых сред выросли блестящие выпуклые колонии белого, палевого, золотистого цвета, окруженные радужной с перламутровым блеском зоной, необходимо подтверждение их принадлежности к *S. aureus*.

Для подтверждения принадлежности подозрительных колоний к *S. aureus* с целью накопления чистой культуры делают пересев подозрительных колоний на поверхность скошенного питательного агара. Посев инкубируют при температуре 37±1 °С в течение 22±2 ч. С чистой культурой проводят ряд дополнительных тестов.

Определяют грампринадлежность исследуемых колоний. *S. aureus* является грамположительным кокком.

Определяют ферментацию маннита или мальтозы в анаэробных условиях: делают посев уколом в среду с маннитом (мальтозой). Инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч. *S. aureus* ферментирует маннит (мальтозу) в анаэробных условиях, что приводит к изменению цвета среды.

Проводят исследование фермента плазмокоагулазы. Для проведения реакции сухую кроличью цитратную плазму разводят согласно рекомендации по применению и разливают по 0,5 мл в 4 стерильные пробирки. В пробирки с раствором плазмы вносят по одной петле исследуемой суточной культуры и инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 4–6 ч. Обязательна постановка двух параллельных контролей: первый контроль — пробирка только с раствором плазмы; второй контроль — пробирка с раствором плазмы, в которую внесена суточная культура стафилококка, заведомо обладающего ферментом коагулазой. Если в эти сроки не наблюдается свертывание плазмы в опытной и первой контрольной пробирках, то реакция плазмокоагуляции считается отрицательной; если плазма в опытной пробирке коагулирована аналогично второму контролю, то реакция считается положительной.

8. Определения *S. aureus* методом накопления

Сущность метода

Метод накопления основан на обогащении *S. aureus* в жидкой среде и выращивании посевов на плотных селективно-дифференциальных средах с последующей идентификацией.

К объему воды 100 мл добавляют приготовленную заранее стерильную навеску 10 г натрия хлористого и 10 мл стерильного 10% пептона. Таким образом, получается среда накопления, содержащая 10% натрия хлористого и 1% пептона. Посев инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 48 ± 2 ч. Затем делают пересев на плотные среды (желточно-солевой агар, агар Байрд-Паркер, маннитно-солевой агар) для получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч. После 24 ч инкубации проводят предварительную оценку посевов, дальнейшая инкубация в течение 24 ч возможна при комнатной температуре.

Дальнейшую идентификацию проводят в соответствии с вышеизложенными рекомендациями.

9. Обработка и выражение результатов

Если на фильтрах и чашках с высевом со среды обогащения нет роста, обнаружен рост нехарактерных колоний или не подтвердилась принадлежность подозрительных колоний к *S. aureus*, выдают отрицательный ответ «не обнаружены лецитиназоположительные стафилококки в 100 мл».

В случае идентификации подозрительных колоний как *S. aureus* выдают положительный ответ: «обнаружены лецитиназоположительные стафилококки в 100 мл».

10. Определение бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) (далее — *P. aeruginosa*) проводят прямым методом фильтрации воды или методом накопления.

Определение бактерий вида *P. aeruginosa* методом накопления

Сущность метода

Метод накопления основан на обогащении *P. aeruginosa* в жидкой среде и выращивании посевов на плотных селективно-дифференциальных средах с последующей идентификацией.

Проведение анализа

Для накопления *P. aeruginosa* используют концентрированную (10-кратную) среду Бонде. Концентрат прибавляется к воде в соотношении 1:10 (100 мл концентрата на 1000 мл воды). Посев инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 22 ± 2 ч.

Из среды обогащения производят пересев на селективно-дифференциальные среды (среды Кинг-А, Блеск, агар с цетримидом). Для высевов из каждого объема используют одну чашку со средой. Высевы производят с расчетом получения максимального количества изолированных колоний. Небольшое количество посевного материала (захватываемого при минимальном смачивании петли или разогнутой петлей) распределяют первоначально в виде площадки 1×4 см у края чашки, затем делают частые многочисленные штрихи по поверхности среды. Посев инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч с предварительным просмотром через 24 ч.

12. Определение бактерий вида *P. aeruginosa* прямым методом

Сущность метода

Прямой метод основан на фильтровании установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на селективно-дифференциальных средах для культивирования *P. aeruginosa* и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

Использование прямого метода посева с фильтрованием без применения среды обогащения допускается в случае исследования воды плавательных бассейнов на фоне эпидемиологического благополучия и при небольшом уровне загрязнения посторонней микрофлорой.

Проведение анализа

При определении *P. aeruginosa* методом фильтрования объем воды 1000 мл фильтруют через мембранный фильтр. Фильтр помещают на плотные селективно-дифференциальные среды (среды Кинг-А, Блеск, агар с цетримидом). Чашки с фильтром ставят в термостат; посевы инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч с предварительным просмотром через 24 ч.

На селективно-дифференциальных средах отмечают рост характерных колоний *P. aeruginosa*. При наличии множественного роста колоний достаточно отобрать для последующего исследования 1–2 наиболее типичных колонии.

13. Идентификация бактерий вида *P. aeruginosa*

Отобранные наиболее типичные колонии отсевают в пробирки со средой Клиглера или в виде бляшек на дифференцирующую среду для псевдомонад (на одной чашке можно поместить от 12 до 24 макроколоний), инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 22 ± 2 ч.

После инкубации на агаре Клиглера отмечают щелочение скоса и столбика среды. Макроколонии *P. aeruginosa* в чашке, как правило, имеют характерную уплощенную, шероховатую форму с неровными краями и кружевным венчиком в результате ограниченного роения, реже — гладкую с ровными краями. Образующийся пигмент придает колониям буроватый оттенок с вариантами от сине-зеленого до коричнево-красного, диффундирует в агар.

При наличии колоний характерной формы, продуцирующей пигмент, исследование заканчивают и выдают положительный ответ. При наличии колоний атипичных, не дающих характерное пигментообразование, определяют грампринадлежность и наличие фермента цитохромоксидазы. При положительных реакциях проводят посев на среду с мальтозой, инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 16–18 ч. Учитывают изменение цвета среды.

Мальтозоотрицательные колонии пересевают в нитратную среду, а также в среду Хью-Лейфсона с глюкозой уколом до дна пробирки.

В нитратной среде после инкубации при температуре 42 ± 1 °С в течение 16–18 ч *P. aeruginosa* развивается в толще всей среды и продуцирует обильное количество свободного азота в виде пены на поверхности среды и иногда — пузырьков газа в толще среды.

В среде Хью-Лейфсона после инкубации при температуре 37 ± 1 °С в течение 16–18 ч для *P. aeruginosa* характерна положительная реакция окисления (окрашивание верхней части среды в желтый цвет).

14. Обработка и выражение результатов

Если на фильтрах и чашках с высевом со среды обогащения отсутствует рост, имеет место рост нехарактерных колоний или не подтвердилась принадлежность подозрительных колоний к *P. aeruginosa*, выдают отрицательный ответ «не обнаружена синегнойная палочка в 1000 мл».

В случае обнаружения подозрительных колоний и подтверждения их принадлежности к *P. aeruginosa* выдают положительный ответ «обнаружена синегнойная палочка в 1000 мл».

Определение возбудителей инфекционных заболеваний в воде плавательных бассейнов проводят в соответствии с действующими нормативно-методическими документами, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Таблица расчета наиболее вероятного числа (НВЧ) колифагов в 100 мл

Число положительных результатов		НВЧ в 100 мл	Вероятность	Нижний предел	Верхний предел
из 1 объема по 50 мл	из 5 объемов по 10 мл				
1	4	16,1	0,4095	1,9	113,9
1	3	9,3	0,3422	1,1	77,4
1	2	5,6	0,3218	0,7	46,4
1	1	3,2	0,3039	0,4	26,2
1	0	1,4	0,2500	0,2	11,5
0	5	6,9	0,0010	0,8	57,6
0	4	5,1	0,0060	0,6	42,5
0	3	3,6	0,0222	0,4	29,6
0	2	2,2	0,0671	0,3	18,5
0	1	1,1	0,1937	0,1	8,8