

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

---

**З. З. ИЛЬЯСОВА**

# **САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ**

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ**

по направлению подготовки  
111400 Водные биоресурсы и аквакультура

Профиль подготовки  
Фермерское рыбководство

Квалификация выпускника  
бакалавр



Уфа  
Башкирский ГАУ  
2015

УДК 619:574.5/6  
ББК 48.1+28.082  
И 49

**Рецензенты:**

Мишуковская Галина Сергеевна - доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии, биохимии и кормления животных ФГБОУ ВПО «Башкирский ГАУ».

Галиева Зульфия Асхатовна - кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры технологии мяса и молока ФГБОУ ВПО «Башкирский ГАУ».

**Ответственный редактор:** зав. кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, доктор биологических наук, профессор Андреева А. В.

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол № 6 от «24» января 2015 г.)

**Ильясова З. З.**

Санитарная гидробиология : учебное пособие / З. З. Ильясова. – Уфа : Башкирский ГАУ, 2015. – 122 с. : ил.

В учебном пособии изложены основные вопросы и методы исследований по разделу общая санитарная гидробиология. Приводятся методики санитарно - микробиологического и санитарно - паразитологического анализа воды поверхностных водоемов. Каждая тема содержит теоретический и методический материал, вопросы для самоконтроля. Представлены термины и определения в области водных объектов, имеются приложения.

Учебное пособие предназначено для проведения занятий по дисциплине Санитарная гидробиология, по программе подготовки бакалавр, направления 111400 Водные биоресурсы и аквакультура, профиль подготовки Фермерское рыбководство, также может быть использовано при проведении факультативных занятий и выполнении научных исследований.

© З. З. Ильясова, 2015  
© Башкирский ГАУ, 2015

## ВВЕДЕНИЕ

Целями освоения дисциплины санитарная гидробиология являются изучение взаимодействия обитателей вод - гидробионтов, их популяций и сообществ - биоценозов друг с другом и с неживой природой; основных объектов исследования гидробиологии -- водными экологическими системами, их структурными и функциональными особенностями, без знания которых невозможно рациональное использование биологических ресурсов, охрана гидросферы от загрязнения, научное прогнозирование ее состояния.

Задачами изучения дисциплины являются: изучение условий существования гидробионтов; ознакомление с основными закономерностями биологических явлений и процессов, происходящих в гидросфере; изучение популяций и биоценозов как надорганизменных форм жизни с характерными структурными и функциональными особенностями; ознакомление с биологической продуктивностью и экологическими аспектами проблемы чистой воды и охраны водных экосистем; изучение биологических ресурсов Мирового океана, отдельных морей, рек, водохранилищ, озер и прудов.

Дисциплина санитарная гидробиология относится к базовой части естественнонаучного цикла. Знания по санитарной гидробиологии базируются на знаниях гидрологии, зоологии, теории эволюции, микробиологии, зоокультуры, водных биоресурсов и их охраны, ихтиологии, экологии.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

ПК-1 способностью использовать профессиональные знания ихтиологии, аквакультуры, охраны окружающей среды, рыбохозяйственного и экологического мониторинга и экспертизы;

ПК-2 способностью участвовать в оценке рыбохозяйственного значения и экологического состояния естественных и искусственных водоёмов;

ПК-3 способностью проводить оценку состояния популяций промысловых рыб и других гидробионтов, водных биоценозов, участвовать в разработке биологических обоснований оптимальных параметров промысла, общих допустимых уловов, прогнозов вылова, правил рыболовства, мониторинге промысла;

ПК-4 способностью применять методы и технологии искусственного воспроизводства и выращивания гидробионтов, борьбы с инфекционными и инвазионными заболеваниями гидробионтов;

ПК-6 способностью участвовать в обеспечении экологической безопасности рыбохозяйственных водоемов, процессов, объектов и продукции аквакультуры, управлении качеством выращиваемых объектов;

ПК-14 готовностью к изучению научно-технической информации, отечественного и зарубежного опыта по тематике исследования;

ПК-15 способностью понимать, излагать и критически анализировать базовую информацию в области рыбного хозяйства;

ПК-16 способностью применять современные методы научных исследований в области водных биоресурсов и аквакультуры.

В результате освоения дисциплины студент должен:

- Знать: основы систематики, строения, жизнедеятельности организмов, биоразнообразие, закономерности эволюции живой природы, закономерности функционирования экологических систем, основные закономерности функционирования водных экосистем, особенности микробиологических процессов в водоемах;

- Уметь: пользоваться микроскопической техникой, лабораторным оборудованием, идентифицировать основные группы организмов, проводить микробиологический анализ;

- Владеть: навыками работы с лабораторным и полевым оборудованием, ведения документации о наблюдениях и экспериментах, методами научных исследований в области водных биоресурсов и аквакультуры, биологического контроля за объектами выращивания.

Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать следующие общие правила:

1. избегать попадания химикатов и растворов на слизистые оболочки рта и глаз, кожу, одежду;

2. не принимать пищу или питье;

3. не курить и не пользоваться открытым огнем;

4. обращать внимание на герметичность упаковки химикатов (реактивов), а также на наличие хорошо и однозначно читаемых этикеток на склянках;

5. избегать вдыхания химикатов, особенно образующих пыль или пары;

6. при работе со стеклянной посудой соблюдать осторожность во избежание порезов кожи рук;

7. при отборе растворов пользоваться пипетками с закрепленным на них резиновыми грушами (не втягивать растворы в пипетку ртом!);

8. добавление к пробам растворов химических веществ и сухих реактивов следует производить в резиновых перчатках и защитных очках.

9. Необходимые при выполнении анализов растворы, реактивы и растворители следует содержать в герметично закрываемых стеклянных флаконах и приготавливать с соблюдением правил, предусмотренных для химико-аналитических работ.

10. Образующиеся при работе отработанные растворы необходимо сливать в отдельную хорошо закрывающуюся склянку и проводить их нейтрализацию растворами щелочей или кислот с концентрацией 5–10%. Нейтрализацию проводят, добавляя постепенно соответствующие растворы и контролируя кислотность раствора по универсальной индикаторной бумажке (до значения pH 6–8).

11. Опасные и едкие вещества (четырёххлористый углерод, серная и азотная кислоты, щелочи и др.) хранить в специальном месте, недоступном для неспециалистов (учащихся), использовать только персоналом (преподавателем или лаборантом).

## Раздел 1 ОБЩАЯ САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ

### 1.1 ПРЕДМЕТ, ЗАДАЧИ И ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ САНИТАРНОЙ ГИДРОБИОЛОГИИ

**Цель занятия.** Изучить отличия задач и методов таких наук как гидробиология и санитарная гидробиология. Изучить становление и историю развития санитарной гидробиологии. Ознакомиться с учеными, которые внесли вклад в развитие гидробиологии и санитарной гидробиологии.

**Предмет, методы и задачи санитарной гидробиологии.** Гидросфера (водная оболочка Земли) вместе с её населением играет важную роль в жизни человека. Водоёмы используют для питьевого и технического водоснабжения (рыбохозяйственные угодья, зоны рекреации (отдых, туризм)) и т.д. Изучением биологических свойств гидросферы занимается гидробиология, а изучением качества воды занимается санитарная гидробиология.

Гидробиология (греч. «hydro» — вода, «bios» — жизнь, «logos» — наука, учение) наука об организмах, обитающих в водной среде, их взаимоотношениях друг с другом и с условиями обитания.

Санитарная гидробиология – раздел общей гидробиологии, которая занимается изучением проблем чистой воды и способствует обеспечению человечества высококачественной водой для сохранения жизни и здоровья, развитию промышленности и повышению продуктивности сельского и рыбного хозяйства.

Санитарная гидробиология изучает взаимодействие обитателей вод — гидробионтов, их популяций и сообществ — биоценозов друг с другом и с неживой природой.

Достижения санитарной гидробиологии используют при разработке методов и средств очистки питьевых и сточных вод. Особенно близко гидробиология соприкасается с *океанологией* и *лимнологией* — географическими дисциплинами, изучающими соответственно морские и континентальные водоемы. Санитарная гидробиология тесно связана с такими дисциплинами как, зоология, ботаника, микробиология, физиология и биогеография. Опираясь на них, гидробиолог получает представление о составе населения водоемов и ряд других сведений, используемых при экологическом анализе.

Для оценки санитарного состояния водоемов применяют различные качественные и количественные методы.

Количественный учет – учет количества (концентрации) различных групп гидробионтов в пределах своего местообитания, оценка функциональной роли этих групп в экосистемах и моделирование экосистем с целью прогноза их состояния и управления ими.

Качественный учет - учет численности и биомассы (суммарной массы) особей, который позволяет уточнить представления об их экологии.

Для количественного учета населения водоемов используют самые разнообразные приборы, обычно погружаемые в водоем с борта судна (дночерпатели, драги, планктонные сети, планктоночерпатели, батометры и др.). С их помощью облавливаются определенные участки воды, грунта или других субстратов, устанавливается

видовой состав, численность и биомасса организмов, найденных в пробах, с последующим пересчетом на единицу площади или объема.

В зависимости от задач гидробиология делится на общую и частную науки. Общая гидробиология изучает биогидросферу в экологическом аспекте и является основной. Частная гидробиология изучает специфику экологии водоемов разного типа (морей, озер, рек и др.) и выделена в ряд дисциплин:

Продукционная гидробиология изучает биологические основы повышения продуктивности водоемов;

Санитарная гидробиология изучает проблемы чистой воды, способы и методы их решения;

Техническая и навигационная гидробиологии изучают биологические явления в воде, с которыми необходимо считаться промышленности и навигации.

Задачи санитарной гидробиологии:

-изучение проблемы чистой воды и принципов биологического самоочищения;

-разработка основ охраны водных экологий от загрязнения;

-изучение условий существования гидробионтов;

-изучение биологических явлений и процессов, происходящих в гидросфере;

-изучение популяций и биоценозов;

-изучение биологических ресурсов Мирового океана, отдельных морей, рек, водохранилищ, озер и прудов.

**История развития санитарной гидробиологии.** Становление санитарной гидробиологии, как самостоятельной науки, относится к середине XIX века. Развитие промышленности и транспорта повлекло за собой загрязнение водоемов, особенно пресных. В результате возникла проблема чистой воды. На первых этапах развития гидробиологии экология водного населения была слабо исследована, скудная систематика, фаунистика, морфология и физиология водных организмов.

В 1869—1870 гг. немецкие ученые А. Мюллер (нем. зоолог и анатом, 1810-1875) и Ф. Ю. Кон (нем ботаник и бактериолог) изучили и выявили огромную роль гидробионтов в процессах самоочищения водоемов.

Рихард Кольквиц (нем. ботаник, 1873-1956), Максимилиан Марссон, (нем. ботаник, 1845-1909) и Яков Яковлевич Никитинский (сов. химик-технолог, 1854-1924) уточнили роль отдельных организмов в процессах биологического самоочищения водоемов и разработали принципы индикации их загрязнения по присутствию в них различных гидробионтов с разной потребностью к чистоте воды.

Стало ясно, что изучение вопросов загрязнения и самоочищения водоемов нельзя вести без учета роли гидробионтов и без знания их экологии. Это послужило важным стимулом к возникновению и развитию гидробиологии, а затем санитарной гидробиологии, а затем и санитарной гидробиологии.

Во второй половине XIX в. было создано большое количество морских и пресноводных биологических станций. Одна из первых морских биологических станций была основана в 1872 г. в Севастополе по инициативе А. О. Ковалевского и существует до настоящего времени.

В 1870 г. немецкий зоолог А. Ф. Дорн изучая морских ракообразных создал морскую биологическую станцию (зоологическую) близ Неаполе. В 1876 г. амери-

канский ученый А. Э. Агассис основал Ньюпортскую станцию на атлантическом побережье США.

В дальнейшем были основаны пресноводные и речные биологические станции. Пресноводные биологические станции: в 1890 г. — на оз.Плен (Германия), в 1891 г. — на оз.Глубокое (Московская обл.), в 1894 г. — на р. Иллинойс (США). В 1900 г. на Волге в Саратове открылась первая в Европе речная биологическая станция.

Для учета концентрации гидробионтов были созданы специальные приборы. Работая в Северном море, В. Гензен в 1887 г. впервые использовал для учета количества организмов в единице объема воды специальную коническую сеть из мелкоячеистого шелкового сита («газа»). В. Гензен впервые ввел термин планктон, в честь него названо исследовательское судно «Виктор Гензен».

Большое значение в развитии гидробиологии имело образование в 1899г. Международного совета по изучению морей и в 1922г. Международной ассоциации теоретической и прикладной лимнологии.

В России первое крупное изучение биологии морей было осуществлено научно-промысловой экспедицией по изучению рыболовства и рыбных запасов в Каспийском море, проведенной в 1853—1856 гг. под руководством К. Бэра и Н. Я. Данилевского. В 1890 – 1891 гг. экспедиция, организованная Н. И. Андрусовым, А. А. Остроумовым и И. Б. Шпиндлером, исследовала Черное море и открыла факт насыщения его глубинных слоев сероводородом. В 1899 – 1906 гг. экспедиция под руководством Н. М. Книповича выполнила большие исследовательские работы на Баренцевом море, а в 1912—1913 гг. собрала огромный гидробиологический материал на Каспийском море. В начале 1920-х годов по распоряжению В. И. Ленина начала работать Азово-Черноморская научно-промысловая экспедиция под руководством Н. М. Книповича. В начале XX века С. А. Зернов (сов. зоолог, гидробиолог) углубленно изучил биоценозы Черного моря. На дальневосточных морях крупные исследования сделаны В. К. Бражниковым (1899—1904), П. Ю. Шмидтом (1900—1901) и В. К. Солдатовым (1907—1913). Большую роль в расширении морских биологических исследований сыграла организация Плавучего морского научного института (Плавморин) в 1921 г. по декрету, подписанному В. И. Лениным. Экспедиционный корабль этого института «Персей» начиная с 1923 г. совершил более 100 экспедиций в Баренцевом, Белом, Карском, Гренландском и Норвежском морях, во время которых участники исследований собрали богатейший материал. В 1922 г. под руководством К. М. Дерюгина организован Государственный гидробиологический институт с большим гидробиологическим отделом по исследованию морей Дальнего Востока. В начале 1930-х годов был создан институт морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО). С 1949 г. на протяжении 20 лет под руководством Л. А. Зенкевича и В. Г. Богорова совершались рейсы экспедиционного судна «Витязь» в водах Тихого океана и значительно расширили представления о жизни гидросферы.

Параллельно морским биологическим исследованиям в нашей стране развивалось и гидробиологическое изучение пресных вод. В 1867 г. Московское общество любителей естествознания организовало обследование озер Московской губернии. В это же время Б. И. Дыбовский изучил фауну оз. Байкал, К. Ф. Кесслер — ихтиофауну Волги, Невы, Ладожского и Онежского озер.

Пресноводные гидробиологические исследования резко усилились при Советской власти. Начиная с 1917 г. одна за другой открылись Байкальская, Окская, Пермская, Болшевская, Костромская, Чистопольская, Севанская и Косинская биологические станции, активизировалась работа на Волжской, Звенигородской, Бородинской, Глубокоозерской, Днепровской и Северодонецкой станциях.

В 1924 г. в Зоологическом институте АН СССР С. А. Зернов создал крупный гидробиологический отдел (с 1932 г. возглавлялся В. И. Жадиным), в 1928 г. Ю. Г. Верещагин организовал Байкальскую лимнологическую станцию (ныне Институт лимнологии). С начала 30-х годов гидробиологические исследования проводились ВНИИ озерного и речного рыбного хозяйства. Знаменательными событиями в дальнейшем развитии пресноводной гидробиологии стала организация Института гидробиологии (1939) и Института биологии внутренних вод (1956).

В настоящее время исследования на морях и пресных водоемах проводят многие институты, университеты, академии России и другие организации. Большое значение для развития гидробиологии в нашей стране имело образование в 1947 г. по инициативе Л. А. Зенкевича Всесоюзного гидробиологического общества и создание в 1964 г. по инициативе Г. В. Никольского Научного совета АН СССР по проблемам гидробиологии, ихтиологии и использования биологических ресурсов водоемов. Особенно следует отметить работу сети учреждений Общегосударственной гидробиологической службы, созданной в 1972 г.

Важное общегосударственное значение гидробиологии придает закон «Правила по охране поверхностных вод от загрязнения сточными водами», обеспечивающие профилактику загрязнения водных объектов.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что изучает санитарная гидробиология?
2. Что изучает океанология и лимнология?
3. Какие методы применяют для оценки санитарного состояния водоемов?
4. Какие задачи изучает санитарная гидробиология?
5. Что послужило развитию санитарной гидробиологии?
6. Какие зарубежные ученые внесли вклад в развитие санитарной гидробиологии?
7. Какие советские ученые внесли вклад в развитие санитарной гидробиологии?

## **1.2 ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ВОДЫ**

**Цель занятия.** Ознакомиться с общими сведениями о воде. Изучить основные физические, химические и биологические показатели качества воды.

**Вода. Общие сведения.** Вода имеется не только в гидросфере, но и в атмосфере и литосфере. Общее количество воды на земном шаре постоянно: количество испаряющейся воды с поверхности водоемов, почв, растительности в среднем равно количеству воды, поступающей с осадками. На разных участках земной поверхности влагооборот может отклоняться от среднего в ту или другую сторону. Вода не только является местом обитания гидробионтов, она служит материалом для создания живой материи. Все три оболочки земного шара (атмосфера, гидросфера и лито-



сфера) заселены живыми организмами, образующими биосферу. В атмосфере граница жизни распространяется на высоту не более 7-8 км. В литосфере - на 5-6 м, только бактерии проникают по трещинам Земли на глубину до 2,5-3,0 км. Дальнейшему проникновению препятствуют высокие температуры и давление. В гидросфере жизнь существует от поверхности до самых глубоких мест, достигающих в океанах 11 тыс.м.

Вода входит в состав живых существ, составляя 60-99,7% от их массы (органов, тканей, тела). Она является основной средой, в которой протекают процессы обмена веществ в организмах и субстратом химико-ферментативных реакций. Вода входит в состав крови, лимфы и других органов как водных, так и наземных организмов. Количество воды в организмах только в два раза меньше, чем во всех реках Земли. Вода имеет важное значение в формировании физико-химических свойств окружающей среды: климата, погоды, круговорота веществ и т.д.

### **Физические показатели качества воды**

При определении степени ухудшения природных вод изменение физических свойств является более чувствительным показателем, чем другие.

*Вкус и запах.* Природные пресные воды не имеют вкуса и запаха. Привкусы и запахи могут появляться в них от пребывания рыбы, развития некоторых водорослей и низших грибов. Запах в воде может появляться при существовании организмов в неблагоприятных условиях и вследствие протекания биохимических процессов в нижних ее слоях или в грунтах, а также под влиянием сточных вод. Очень часто при исчезновении запахов сохраняется неприятный привкус или этот привкус приобретают водные организмы.

Вкус и запах воды определяют органолептически и выражают в баллах:

0 - нет запаха и вкуса;

1 - очень слабый. Обнаруживается только опытными исследователями.

2 - слабый. Обнаруживается всеми, если обратить их внимание.

3 - заметный. Легко обнаруживается всеми и вызывает неодобрительный отзыв.

4 - сильный. Обращает на себя внимание и заставляет воздерживаться от употребления воды или других продуктов.

5 - очень сильный. Вода и продукты непригодны к употреблению.

Если вода имеет сомнительные санитарные качества, то ее вкус определяется после кипячения и охлаждения. *Различают 4 вида вкуса:* соленый, горький, кислый, сладкий. Все остальные вкусовые ощущения определяют как *привкусы*, например рыбный, фенольный, нефтепродуктов, хлорный и т.д.

*Прозрачность воды* зависит от наличия в ней взвешенных веществ, а также от температуры и цвета воды. Чем больше цвет приближается к голубому, тем прозрачнее вода. Приближение к желтому снижает прозрачность, что и наблюдается в водоемах с гуминовыми водами, которые имеют желтую и желто-коричневую окраску.

Прозрачная вода, в которой нет никаких примесей, в тонком слое бесцветна, в толстом слое имеет голубой цвет, переходящий в синий при больших глубинах. Наличие другой окраски указывает на присутствие в воде каких-то растворимых, взвешенных веществ или примесей. Изменение цвета воды не оказывает видимого прямого влияния на условия обитания водных организмов, но может сказаться косвенно через изменения прозрачности.

Температура влияет на плотность и прозрачность воды. Чем выше температура, тем ниже плотность воды и наоборот, чем ниже температура, тем выше плотность воды. Поэтому зимой прозрачность воды выше, чем летом. Прозрачность воды в водоемах обычно определяют по белому диску и выражают в метрах.

В лабораторных условиях прозрачность определяют путем чтения специального шрифта через столб воды, налитой в цилиндр (прибор Снеллена) с плоским дном, и выражают в сантиметрах столба воды, через который читается шрифт.

*Цвет воды* может определяться визуально - путем просматривания на водоеме столба воды высотой 0,5 м над белым диском или рассматриванием сверху столбика воды в приборе Снеллена на белом фоне. Результат описывается словесно: цвет зеленый, бурый и т.д. с указанием оттенков: слабо-желтый, коричневый и т.п.

Также цветность определяют по шкалам с растворами, имеющими цветность воды. Обычно применяют платиново-кобальтовую шкалу и выражают цветность в градусах этой шкалы. Эта шкала пригодна для большинства природных вод.

Мутную воду перед определением цветности фильтруют. При сильном развитии фитопланктона и поступлении в водоем окрашенных сточных вод цветность определяют визуально.

Цветность большинства природных вод колеблется в пределах 15-300. Только воды болотного происхождения, богатые гумусом могут иметь более высокую цветность. Для рыбоводных целей мало пригодны воды с цветностью выше 500.

#### **Химические показатели качества воды.**

*Формирование состава воды.* В природе нет совершенно одинаковых вод. Состав воды - сложный комплекс минеральных и органических веществ, газов и ионов растворимых в ней. В природных водах найдено 45 химических элементов. Большая часть элементов находится в воде в виде ионов, некоторые в коллоидном состоянии. Газы находятся в молекулах, органические вещества – в коллоидном и молекулярном состоянии.

Формирование состава воды начинается в атмосфере, где из воздуха переходят в воду газы (кислород, двуокись углерода, аммиак, азот и его окислы) и некоторые соли (хлориды, сульфаты, фосфаты), насыщаются минеральными, органическими веществами и другими компонентами. Установлено, что на 1 га почвы с дождем выпадает до 20 кг хлора и серы. Завершается формирование состава воды после выпадения ее на землю, где она вымывает различные вещества из земной коры и меняет свой газовый состав.

*Строение молекулы воды.* Химическая формула чистой воды хорошо известна  $H_2O$ . Однако установлено, что состав молекулы воды более сложен в связи с существованием нескольких изотопов водорода ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$ ) и кислорода ( $O_{15}$ ,  $O_{16}$ ,  $O_{17}$  и др.). Поэтому в состав молекулы воды могут входить различные изотопы водорода и кислорода и в природной воде наряду с обычными ее молекулами, имеющими молекулярную массу 18, имеются молекулы с молекулярной массой 19, 20, 21 и 22. Природная вода представляет собой смесь девяти изотопных разновидностей воды, в которой 99,73% составляет  $H_2O_{16}$  с молекулярной массой 18. Если в состав молекулы воды входит изотоп водорода – дейтерий  $H_2$  (обычно его обозначают D), то такую воду называют тяжелой водой ( $D_2O$ ). В воде рек ее находится до 150 г на 1 т.

*Растворенные газы.* Из растворенных газов в воде наибольшее значение имеют кислород -  $O_2$  и двуокись углерода -  $CO_2$ .

Кислород -  $O_2$ . Содержание его в воде зависит от обогащения воды кислородом и расхода его на биологические и химические процессы. Обогащение идет за счет адсорбирования газа поверхностными слоями воды из воздуха и за счет ассимиляционной деятельности водных растений (фотосинтез). Расходуется кислород в водоемах на дыхание водных растений, животных и на биохимические и химические окислительные процессы. При больших расходах  $O_2$  в водоеме может возникнуть кислородный дефицит, который может сопровождаться заморами. Величина суточного содержания  $O_2$  в водоемах меняется в течение года и различна для разных водоемов. Наибольшее насыщение воды происходит в холодные осенний и зимний периоды года.

Двуокись углерода –  $CO_2$ . Этот газ почти всегда имеется в воде в растворенном состоянии и частично (около 1%) в виде угольной кислоты  $H_2CO_3$ . Образование и накопление  $CO_2$  в воде происходит за счет дыхания водных организмов, протекания биохимических процессов, различных видов брожения, процессов, происходящих в глубинах Земли, и в меньшей степени от поступления ее из воздуха. Наличие в воде углекислоты имеет большое значение для водных растений являясь источником углерода. Из других газов в природных водах иногда встречается сероводород, метан и аммиак. Помимо фотосинтеза двуокись углерода расходуется в процессе перехода карбонатов (нерастворимых средних солей угольной кислоты) в растворимые гидрокарбонаты.

*Активная реакция воды (кислотность или щелочность)* обуславливается существующим в ней соотношением кислых (H) и щелочных (ОН') ионов. Если их количества равны, то реакция будет нейтральной. В случае преобладания щелочных ионов – щелочной, кислых ионов – кислой. Реакцию среды выражают водородным показателем, который обозначается символом рН (по предложению Серенсена). Для чистой воды, не имеющих никаких примесей, рН будет равным 7, т. е. вода будет нейтральной. В щелочной среде рН будет больше 7, а в кислой – меньше 7. Водные организмы могут обитать в воде только при определенном рН. Природные воды всегда содержат в своем составе различные растворенные вещества, поэтому редко имеют нейтральную реакцию. В пресных водоемах она чаще бывает слабощелочной (рН 6,5-8,2, более 8 при интенсивном фотосинтезе). Воды, стекающие с болот и воды дистрофных водоемов обычно имеют кислую реакцию (рН 4-6) ввиду наличия в их составе гуминовых кислот.

*Биогенные вещества и микроэлементы.* Биогенные веществами (биогены) - вещества, входящие в состав организмов и имеющие определенное биологическое значение. Образуются они в воде в результате жизнедеятельности организмов. Помимо кислорода, углерода, водорода, (98% массы организмов), к этой группе веществ относится азот, фосфор, железо, кремний и ряд других элементов (калий, кальций, натрий, магний, марганец, йод и т. д.). Для существования и развития водных организмов большое значение имеют азот, фосфор, железо, кремний, калий. Недостаток их в воде может значительно снижать биологическую продуктивность водоемов.

**Азот.** В природных водах азот находится в виде растворенного газа и в виде органического и неорганического его соединений. Может он поступать в водоем и со сточными водами. По количественному его содержанию можно судить о степени загрязнения водоемов. Из неорганических соединений азото в воде присутствуют:

солевой аммиак или азот аммонийный ( $\text{NH}_4$ ), соли азотистой кислоты – нитриты ( $\text{NO}_2$ ), соли азотной кислоты ( $\text{NO}_3$ ). Между этими формами существует определенное соотношение.

**Фосфор.** В природных водах фосфор встречается в виде растворимых и нерастворимых (взвеси) неорганических и органических соединений в виде растворов, коллоидных частиц и в адсорбированном состоянии на коллоидах. Неорганический фосфор находится в воде в виде растворимых солей ортофосфорной кислоты ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Фосфаты являются питательной средой для водных организмов и особенно необходимы для развития фитопланктона и высших растений. Фосфор, используемый растениями и животными, возвращается обратно в водоем в процессе их жизнедеятельности и распада отмерших организмов. Содержание фосфатов в воде водоемов колеблется: летом их больше, в другие сезоны меньше. Присутствие фосфора в большом количестве указывает на загрязнение водоема.

**Железо** – важный биогенный элемент, присутствующий почти во всех природных водах в виде растворимых соединений закиси ( $\text{Fe}_2$ ) и окиси ( $\text{Fe}_3$ ) железа, а также в комплексных соединениях с органическим веществом. Оно входит в состав крови животных, человека и хлорофилла растений. Недостаток его в воде может тормозить цветение водорослей, а избыток – оказывать ядовитое действие на водные организмы.

*Микроэлементы.* В природных водах они находятся в очень низких концентрациях – в сотых и тысячных долях мг/л, что связано с их малой растворимостью.

*Органические вещества* поступают в водоемы в результате вымывания из почв. В основном это продукты распада отмерших животных и растений. Органические вещества находятся в воде во взвешенном состоянии, в растворенном и коллоидном виде. Одни легко усваиваются бактериями, другие трудно (водный гумус). Состав органических веществ сложен, разнообразен и недостаточно изучен. Много органических веществ в болотных водах, в водах торфяных карьеров и в загрязненных водах. В речных водах примерно 20 мг/л, в океанических – 4 мг/л. Определение органических веществ в воде сложно и трудоемко. О количестве их можно судить по цветности воды, по спектру поглощения и другим методам.

*Общее количество растворенных и взвешенных веществ* определяют условия существования в водоемах гидробионтов, особенно организмов, живущих за счет сестона. От количества и состава взвешенных веществ зависят условия их питания. Взвешенные вещества могут быть минеральными и органическими, а также органоминеральными. Большое количество взвешенных частиц отрицательно сказывается на распределении и питании водных организмов. Иногда из-за большой мутности воды в нижнем слое водоёмов отсутствует зоопланктон. Очень много минеральных взвешенных веществ в воде горных рек, особенно после дождей. Количество взвешенных веществ в воде определяют путем фильтрования определенного ее объема через предварительно взвешенный фильтр. Выпариванием фильтрованной воды определяют сухой остаток.

#### ***Биологические показатели качества воды.***

Биологические методы оценки качества воды и грунтов разделяются на биологические, физико-химические и бактериологические. Биологические и физико-химические исследования качества воды характеризуют ее только в момент отбора проб на определенном участке.

При биологических исследованиях изучают не только воду, но и весь водоем в целом, его население, грунты, ход биохимических процессов и другие факторы, влияющие на условия обитания водных организмов. В связи с развитием новых производств, сбрасывающих в водоемы сточные воды с неизвестным или малоизученным составом, биологический метод имеет большое значение.

Бактериологические исследования ведутся в двух направлениях:

1. Определение числа микроорганизмов в единице объема (обычно в 1мл воды или в 1г грунта) для выращивания патогенных бактерий в целях предотвращения эпидемий.

2. Определение патогенных микроорганизмов, и организмов разрушающих загрязнения и участвующих в круговороте веществ в водоеме.

Состав и количество микрофлоры в воде является показателем ее качества. В олиготрофных озерах насчитывается до 150 тыс. бактерий в 1мл воды; в мезотрофных – от 500 тыс. до 1,5 млн. в 1мл воды; в эвтрофных - в среднем 2-4 млн. в 1мл воды. В ряде случаев количество бактерий может быть значительно большим, например, в удобряемых водоемах.

Санитарная оценка воды производится обычно не по общему содержанию бактерий, а по содержанию в ней гетеротрофных микроорганизмов - разрушителей органического вещества, бактерий группы кишечной палочки (БГКП) – показателей фекального загрязнения водоемов и патогенных микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний.

В качестве показателей санитарной оценки степени загрязнения воды или грунта приняты титр кишечной палочки:

коли-титр – наименьшее количество воды (в миллилитрах) или грунта (в граммах), в котором обнаружена одна кишечная палочка;

коли-индекс – количество клеток кишечной палочки, находящихся в определенном объеме воды (1л) или грунта (1кг). Чем больше загрязнение воды, тем меньше коли-титр и тем выше коли-индекс.

По ГОСТу, водопроводная вода не должна содержать свыше 100 бактерий в 1мл и иметь коли-индекс не более 3, а коли-титр не меньше 300.

Природные водоемы населены организмами, различно реагирующими на изменение среды их обитания: одни из них более чувствительны, другие – менее к неблагоприятным воздействиям.

Наличие в водоеме чувствительных организмов указывает на хорошее качество воды, а малочувствительных свидетельствует о его загрязнении. Каждая степень загрязнения характеризуется наличием определенной группы организмов.

Организмы, обладающие комплексом физиологических особенностей, обуславливающих их способность жить и развиваться в загрязненных водах, называются сапробными организмами.

### **Вопросы для самоконтроля занятий:**

1. Для чего нужна вода, чем она служит?
2. Какие физические, химические и биологические показатели качества воды изучают при определении степени ухудшения природных вод?
3. Что такое коли-титр и коли-индекс воды, каким нормам должна отвечать вода?

### 1.3 САМООЧИЩЕНИЕ ВОДОЁМОВ

**Цель занятия.** Изучить такое явление, как самоочищение вод. Изучить физические, химические и биологические факторы самоочищения вод.

**Самоочищение водоемов.** Интереснейшим явлениям природы является способность открытых водоемов (реки, озера и водохранилища) под влиянием естественных факторов к самоочищению и установлению биологического равновесия.

*Самоочищение вод* – совокупность природных процессов, направленных на восстановление экологического благополучия водного объекта путём превращения органических и неорганических веществ в безвредные соединения.

*Водоем* — это сложная живая система, где обитают растения, специфические организмы, в том числе и микроорганизмы, которые постоянно размножаются и отмирают.

Если в водоем попадают бактерии или химические примеси, то происходит процесс самоочищения и вода восстанавливает свою первоначальную чистоту. Быстрота самоочищения зависит от многоводности, скорости течения воды и ветра, способствующих перемешиванию воды в водоеме. В крупных водоёмах вода очищается интенсивнее, чем в мелких. Процессы самоочищения протекают более интенсивно в теплое время года. В реках для самоочищения необходим пробег воды не менее 15 км от места загрязнения при условии отсутствия новых загрязнений на пути течения воды.

Минерализация органических загрязнений происходит за счет биохимических процессов, протекающих с участием разнообразных гидробионтов, как в водной среде, так и в донных отложениях. Аэробные процессы происходят преимущественно в верхних слоях водоема, а анаэробные — на дне водоема, куда кислород воздуха не поступает. В результате органические вещества, распадаясь на менее сложные, постепенно минерализуются.

В самоочищении водоёмов принимают участие все гидробионты, главную роль играют бактерии, водоросли, грибы, различные беспозвоночные, простейшие и многоклеточные организмы - фильтраторы. Поэтому одна из важнейших природоохранительных задач состоит в том, чтобы поддерживать эту способность. Ошибочно причислять к процессам самоочищения водоёмов разбавление сточных вод, при котором происходит лишь уменьшение концентрации загрязняющих веществ.

Санитарный режим водоема характеризуется количеством растворенного в нем кислорода. Его должно быть не менее 4 мг на 1 л воды в любой период года для водоемов первого и второго видов.

Водоёмы первого вида - водоемы, используемые для питьевого водоснабжения.

Водоёмы второго вида – водоёмы, используемые для купания, спортивных мероприятий, а также находящиеся в черте населенных пунктов.

Водоемы, предназначенные для сохранения и воспроизводства ценных пород рыб, должны содержать не менее 6 мг растворенного кислорода на 1 л воды.

С санитарной точки зрения самоочищение воды полезное явление в природе. Однако этот процесс у открытых водоемов неограничен — при сильном и постоянном загрязнении самоочищение воды становится недостаточным. Поступающие в

водоем загрязнения вызывают нарушение естественного равновесия. Это наблюдается при бесконтрольном выпуске хозяйственно-фекальных и промышленных сточных вод в водоемы, что вызывает скопление гниющего ила, появление токсических химических соединений, развитие полисапробной флоры и массовый мор рыбы.

**Факторы самоочищения водоемов.** Факторы самоочищения водоемов многочисленны и разнообразны. Механизмы процессов самоочищения водоемов делят на три группы: физические, химические и биологические.

*Физические факторы самоочищения водоёмов.* К числу физических факторов самоочищения относят осаждение нерастворимых примесей, отстаивание загрязнённых вод, испарение и др. процессы.

Важное значение имеет разбавление, растворение и перемешивание поступающих загрязнений. Хорошее перемешивание и снижение концентраций взвешенных частиц обеспечивается интенсивным течением рек. Физические явления осаждения тесно связаны с жизнедеятельностью гидробионтов — фильтраторов и седиментаторов.

Микроорганизмы под собственной тяжестью или осаждаясь на других органических и неорганических частицах постепенно опускаются на дно, подвергаются действию физических факторов, что способствует быстрому отмиранию загрязняющей микрофлоры. Сдерживает этот процесс снижение температуры воды, благоприятствующее длительному сохранению попавших в водоем бактерий и вирусов. *Например, в зонах с умеренным климатом река самоочищается через 200-300 км от места загрязнения, а на Крайнем Севере — через 2 тыс. км.*

Важным физическим фактором самоочищения водоемов является ультрафиолетовое излучение солнца, лучи которого проникают на глубину более одного метра. Под влиянием этого излучения происходит обеззараживание воды. Эффект обеззараживания основан на прямом губительном воздействии ультрафиолетовых лучей на белковые коллоиды и ферменты протоплазмы микробных клеток. Ультрафиолетовое излучение может воздействовать не только на вегетативные клетки, но и на споровые формы и вирусы.

*Химические факторы самоочищения водоёмов.* К числу химических факторов самоочищения относят - окисление органических и неорганических веществ кислородом и перекисью водорода, растворенными в воде, переход в гидранты, коагуляция, нейтрализация и гидролиз токсикантов.

Оценку самоочищения водоема дают по отношению к легко окисляемому органическому веществу (определяемому по биохимической потребности кислорода — БПК) или по общему содержанию органических веществ (определяемому по химическому потреблению кислорода — ХПК).

Оценку самоочищения производят и по содержанию конкретных соединений или их групп (фенолов, углеводов, смол). *Например,* при самоочищении от ионов Fe, Mg, Al преобладающим процессом является реакция образования гидроксидов этих металлов с последующим их осаждением.

Самоочищение от ионов тяжелых металлов происходит за счет целого ряда процессов: соосаждения с гидроксидами металлов, сорбции ионов органическими коллоидами, образования сложных металлоорганических комплексов с гуминовыми кислотами. Удаление тяжелых металлов зависит от рН воды, окислительно-восстановительных условий, концентрации металлов.

В результате - вода освобождается от тяжелых металлов, а в донных отложениях происходит их накопление. Изменение окислительно-восстановительных условий в донных осадках может привести к переходу ионов металлов в водный слой, т.е. к вторичному загрязнению воды.

*Биологические факторы самоочищения водоёмов.* К числу биологических факторов самоочищения относят включение загрязняющих веществ в обменные процессы, их разрушение или перевод в другие, не токсические формы соединений у гидробионтов. В процессе самоочищения водоема участвуют водоросли, плесневые и дрожжевые грибы, моллюски, устрицы, амёбы.

Однако, фитопланктон не всегда положительно воздействует на процессы самоочищения: в отдельных случаях массовое развитие сине-зеленых водорослей в искусственных водоемах можно рассматривать как процесс самозагрязнения.

Самоочищению водоемов от бактерий и вирусов могут способствовать простейшие, коловратки, рачки, моллюски, некоторые растительные и животные организмы, которые питаются органическими веществами и бактериями. Они извлекают из воды огромные количества взвешенных веществ и выбрасывают непереваренный материал в виде фекальных комочков, легко оседающих на дно.

Двустворчатые моллюски — постоянные обитатели водоемов — являются санитарами рек. Пропуская через себя воду, они отфильтровывают взвешенные частицы. Мельчайшие животные и растения, а также органические остатки поступают в пищеварительную систему, несъедобные вещества оседают на слое слизи, покрывающей поверхность мантии двустворчатых. Слизь по мере загрязнения перемещается к концу раковины и выбрасывается в воду. Комочки слизи (псевдофекалии) представляют собой комплексный концентрат для питания микроорганизмов. Они и завершают цепь биологической очистки воды. Каждый моллюск профильтровывает в сутки более 30 л воды. Устрица и некоторые амёбы адсорбируют кишечные и другие вирусы.

Таким образом, гидробионты ускоряют процессы осаждения, способствуя очистке воды от взвешенных веществ.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Какую роль играют гидробионты в очищении вод?
2. Что такое водоемы первого и второго вида?
3. Какие существуют физические факторы самоочищения вод?
4. Какие существуют химические факторы самоочищения вод?
5. Какие существуют биологические факторы самоочищения вод?

### **1.4 ИСТОЧНИКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЁМОВ**

**Цель занятия.** Изучить понятие загрязнение вод. Изучить причины загрязнения водоемов. Изучить основные показатели качества водоемов. Изучить основные группы загрязняющих веществ. Изучить естественные и антропогенные загрязнения водоемов.

**Загрязнение водоемов** – изменение физических, химических и биологических свойств воды, ухудшение экономического значения и биосферных функций водоемов в результате антропогенного поступления в них вредных веществ.



Причиной загрязнения водоемов служат интенсивное развитие промышленности, сельского хозяйства, рост населения, индустриальные, сельскохозяйственные и бытовые стоки. Наиболее подвержены загрязнению пресные воды, но также интенсивно загрязняются моря и океаны.

*Например, в океан ежегодно попадает с атмосферными осадками, стоками и из воздуха тысячи тонн инсектицидов применяемых против комаров и вредителей сельскохозяйственных культур. Этот ядовитый пестицид накапливается в гидробионтах и попадает в пищу человека. Также ежегодно в океаны и моря сбрасывается более 2,5 млн. т нефти.*

Согласно правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами, поверхностные воды (река или иной водоём) считаются загрязнёнными, если их состав или свойства изменились под прямым или косвенным влиянием производственной деятельности и бытовых условий населения, и они стали в результате этого непригодными для одного или нескольких видов водопользования. Существуют санитарно-гигиенические и рыбохозяйственные требования, предъявляемые к качеству воды. *Например, критерием качества воды для рыбохозяйственного водопользования является пригодность её для обитания и развития промысловых рыб и других промысловых водных организмов, сохранения и роста их запасов, обеспечивающих определенный уровень уловов.*

Качество вод рыбохозяйственных водоёмов определяется физико-химическими и биологическими показателями, отклонение от которых указывает на загрязнённость воды. Вода является чистой, если в ней не нарушается нормальный ход биологических процессов, могут существовать, размножаться и давать полноценное потомство рыбы и другие водные организмы, если её свойства благоприятствуют обеспечению промысловой плотности рыб или других промысловых объектов и высокого качества продукции.

Понятия чистая и загрязнённая вода условны, т.к. они характеризуют не свойства воды, а требования, предъявляемые к ней. Каждого водопотребителя интересуют только те свойства воды, которые определяют пригодность её для нужд данного вида водопользования. При условии наличия этих свойств вода считается чистой, при отсутствии — загрязнённой.

С биологической точки зрения можно считать чистой ту воду, в которой могут нормально существовать полезные человеку биоценозы и не наносить вреда здоровью. Если же эти свойства изменены в худшую сторону, в результате деятельности человека (естественные природные загрязнения не учитываются), то вода считается загрязненной.

Существует такая форма загрязнения, как антропогенное эвтрофирование водоемов (eu-хорошо, trofe-пища), т.е. водоёмы богатые пищей, в результате чего происходит нарушение режима внутренних водоемов – рек, озер, водохранилищ. Выражается оно в интенсивном развитии фитопланктона, главным образом сине-зеленых водорослей («цветение» воды), интенсивном зарастании прибрежных мелководий водной растительностью, вследствие чего ухудшается качество воды (дефицит кислорода, неприятный вкус и запах и т.п.). Все эти изменения вызываются повышенным поступлением в водоёмы биогенных веществ – азота и фосфора (из источников, связанных с деятельностью человека: это городские, промышленные стоки и стоки с сельскохозяйственных угодий). *Например, со стоками с полей в во-*

доемы может попадать до 20-40% внесенного с удобрениями азота и свыше 1,5 % фосфора.

Загрязнение, эвтрофикация и термофикация водоемов, забор больших объемов воды, последствия гидростроительства отражаются не только на водопользовании, но и на биосферной роли водных экосистем. Загрязняющие вещества делят на 3 основные группы:

1) органические нетоксичные загрязнения. Фекальные стоки, отходы лесосплава, целлюлозные волокна в сбросах бумажных комбинатов и другое. Они могут вызывать гибель гидробионтов вследствие механического воздействия, ухудшения кислородного режима, образования сероводорода.

*Например: волокна целлюлозы, присутствующие в стоках целлюлозно-бумажных фабрик, опускаясь на дно, погребая под собой население дна, губительно действуя на развитие бентоса. Сильное подавление его наблюдается в реках, по которым проходит сплав больших количеств леса.*

2) Минеральные и органические токсичные вещества. Из минеральных токсичных веществ особенно ядовиты цианиды, соединения мышьяка, свинца и меди. *Например, оксид мышьяка ( $As_2O_3$ ) смертелен для рыб в концентрации 10-20 мг/л, а для планктонных ракообразных в количествах 0,25-2,5 мг/л. Соединения свинца губельны для планктонных ракообразных в концентрации свыше 0,5 мг/л, для рыб - 10-150 мг/л. Столь же ядовиты для гидробионтов соединения меди, в частности медный купорос, вызывающий гибель водорослей, планктонных ракообразных и бентосных организмов в дозах от 1 до 100 мг/л. Менее вредны различные неорганические кислоты и щелочи, смертельные концентрации которых обычно выражаются в граммах на 1 литр. Из органических токсичных загрязнений, наиболее вредны синтетические моющие средства – детергенты, обладающие большой биохимической стойкостью, фенол, креозот и нафтенновые кислоты, смертельные дозы которых обычно составляют 10-100 мг/л. Особенно опасны феноловые кислоты.*

3) Смешанные загрязняющие вещества. К ним относят гербициды и пестициды. При обработке пестицидами лесных и сельскохозяйственных угодий с помощью авиации от 25 до 75% этих препаратов разносится ветром на огромные расстояния, на сотни и тысячи километров. Среди применяемых пестицидов преобладают стойкие хлорорганические соединения, аккумулирующиеся в тканях организмов.

Чрезвычайную опасность, прежде всего для человека, представляет поступление в водоемы радионуклидов вместе с отходами атомных судов, электростанций, некоторых производств.

Одной из своеобразных форм загрязнения водоемов является термальное загрязнение в результате сброса в водоемы нагретых вод, прошедших через системы водяного охлаждения тепловых, атомных электростанций и промышленных предприятий.

Обычно температура термальных вод на 5-13<sup>0</sup>С выше, чем природных, что приводит к изменению термического режима водоема, уменьшению их насыщенности кислородом, смещению гидрологических сезонов.

**Естественные загрязнения водоемов.** Большое количество природных загрязнений поступает в водоёмы весной с паводковыми водами в составе которых имеются растворимые и нерастворимые загрязняющие вещества: растительные остатки, продукты размыва берегов, мусор, некоторые вещества, вымываемые из почв,

и т.д. Много взвесей и других загрязнений может поступать в водоёмы во время дождей, ливней, оттепелей, с образующимися стоками. Наиболее сильное естественное загрязнение наблюдается вследствие развития в водоёмах в больших количествах различных водорослей, что приводит к «цветению» воды. В зависимости от природы и количества развивающихся водорослей «цветение» может играть не только отрицательную, но иногда и положительную роль, ускоряя самоочищение воды. При сильном цветении резко ухудшаются физико-химические свойства воды и в водоёме могут возникать заморные условия для рыб.

Водоём может быть загрязнён в результате накопления в нём органического вещества, особенно в донных отложениях, за счёт отмирания растительных и животных организмов и приноса извне. Наличие большого количества органических веществ является благоприятной средой для развития бактерий и протекания биохимических процессов, вследствие которых поглощается растворённый кислород, и выделяются вредные продукты их распада ( $H_2S$ ,  $CO$ ,  $NH_3$  и др.).

При сильном волнении взмучиваются донные отложения, что может сильно ухудшить физико-химические свойства воды и усилить поглощение кислорода на окисление органических веществ. Наиболее сильно это проявляется в озёрах, а также в водохранилищах, особенно в приплотинных участках, где накапливаются донные отложения. При большом содержании в донных отложениях органических веществ на их окисление может поглощаться из воды от 30% до 90% кислорода от общего его количества. В результате кислородный режим водоёма может быть сильно нарушен. За зимний период в незагрязнённом водохранилище приблизительно 1/3 запасов растворённого в воде кислорода расходуется на окисление продуктов распада донных отложений.

В природных водоёмах имеются и другие естественные и близкие к ним загрязнения, которые не являются следствием активной деятельности человека. Некоторое количество загрязнений поступает в водоёмы при водопое и купании диких животных, при засорении их отмершей древесиной и т.д. Природным загрязнением также являются некоторые компоненты поступающие из подстилающих водоёмы земных пород.

**Антропогенные загрязнения водоемов.** В результате деятельности человека в водоёмы поступает большое количество различных загрязнений в жидком, твёрдом, коллоидном и эмульгированном состоянии. Некоторые загрязнения в газообразном виде выбрасываются в атмосферу, а затем с осадками поступают в водоёмы.

Различают пять основных групп загрязнений водоемов:

1. Атмосферные воды несут вымываемые из воздуха загрязнители промышленного происхождения. При стекании по склонам атмосферные и талые воды дополнительно увлекают с собой органические и минеральные вещества. Особенно опасны стоки с городских улиц и промышленных площадок, несущие мусор, фенолы, нефтепродукты, кислоты и др.

2. Городские сточные воды включают бытовые стоки, содержащие фекалии, детергенты (ПАВ и приготовленные из них синтетические моющие вещества (детергенты, СМВ), получившие в последние годы широкое применение в промышленности и быту), микроорганизмы, в том числе патогенные. Через воду могут передаваться опасные заболевания, как холера, брюшной тиф, дизентерия, вирусный гепатит и др. Особенно опасны необеззараженные стоки инфекционных и ветеринарных

больниц. Основными их составными частями являются различные пищевые и другие отбросы, растворимые, взвешенные и эмульгированные органические вещества. Городские сточные воды представляют собой бытовые сбросы от населённых мест, стоки и отходы от животноводческих хозяйств. Поверхностный сток с городских территорий составляет 10-15% от хозяйственно-бытовых стоков. Этот вид сточных вод особенно загрязнен, поскольку содержит и загрязнения, вымываемые из атмосферного воздуха. В последние годы в городские канализации бытовых сточных вод стали поступать и промышленные загрязнители с производственными сточными водами.

3. Промышленные загрязнения - основной источник загрязнения водоёмов. Это органические и минеральные отходы от различных производств и промыслов, остатки сырья и реагентов. Наибольшее их количество поступает в водоёмы в виде производственных сточных вод, тёплых вод от тепловых и атомных электростанций и других производств, частично в виде смывов (с загрязнённых берегов и мест хранения отходов), а также в виде отдельных твёрдых и полужидких выбросов. Состав сточных вод разнообразен, сброс велик, несмотря на осуществление больших мероприятий по его сокращению и уменьшению образования промышленных стоков. Наибольшее количество вредных отходов поступает в водоёмы со сточными водами химической, нефтяной, нефтехимической, целлюлозно-бумажной промышленности, предприятий органического синтеза, горнорудной, металлургической промышленности и с шахтными водами. С ростом новых производств образуются сточные воды с неизученным составом.

Промышленные сточные воды образуются в самых разнообразных отраслях производства:

*Энергетика* — потребляет чрезвычайно большие объёмы воды; загрязнение естественных водоёмов продуктами сгорания топлива, остатками нефтепродуктов, кислотами, солями; изменение теплового режима водоёмов. Температура является важной гидрологической характеристикой водоёма, показателем возможного теплового загрязнения. Электростанции сбрасывают в водоёмы воду, имеющую температуру на 8-12°C больше, чем забираемая из того же водоёма вода. Тепловое загрязнение опасно тем, что вызывает интенсификацию процессов жизнедеятельности и ускорение естественных жизненных циклов водных организмов, изменение скоростей химических и биохимических реакций, протекающих в водоёме. В условиях теплового загрязнения значительно изменяются кислородный режим и интенсивность.

В условиях теплового загрязнения значительно изменяются кислородный режим, интенсивность процессов самоочищения водоёма, фотосинтеза и др. свойств. В результате нарушается природный баланс водоёма, складываются особые экологические условия, негативно сказывающиеся на животном и растительном сообществе.

Негативное влияние теплового загрязнения:

подогретая вода дезориентирует водные организмы, создавая условия для истощения пищевых ресурсов;

усиливаются температурные различия по вертикальным слоям, особенно в холодный сезон, по «вывернутому» типу, противоположному тому, который складывается в результате естественного распределения температур воды;

уменьшается концентрация растворённого кислорода, что усугубляет кислородный режим, особенно в зонах сброса коммунально-бытовых стоков;

многие водные организмы, и в частности рыбы, находятся в состоянии стресса, что снижает их естественный иммунитет;

происходит массовое размножение сине-зелёных водорослей;

образуются тепловые барьеры на путях миграций рыбы;

уменьшается видовое разнообразие растительного и животного «населения» водоёмов и др.

*Водный транспорт* является одним из основных источников загрязнения водоёмов, особенно нефтепродуктами. Многие суда, курсирующие на внутренних водоёмах не обеспечены ёмкостями для сбора фекально-бытовых стоков, отходов, отработанных нефтепродуктов, масел и обтирочных материалов. В ряде бассейновых пароходств плохо организован сбор с судов отработанных нефтепродуктов и других загрязнений вследствие недостаточного количества необходимых приемников или недостаточной их ёмкости. Большое количество загрязнений от водного транспорта поступает в водоёмы в результате утечек нефтепродуктов, промывки нефтеналивных барж и танкеров и при аварийных выбросах. Более 48% нефтепродуктов в морскую среду поступает от танкерного флота, причём около 10% от этого поступления приходится на аварии. На региональном уровне крупные разливы нефти означают экологическую катастрофу местного масштаба, что сопровождается массовой гибелью птиц и морских животных, упадком рыболовства.

*Железнодорожный транспорт.* Попадающая в водоём сточная вода, образующаяся при мойке оборудования, подвижного состава и узлов несёт в себе нефтепродукты, щёлочи, моющие средства, фенолы и др.

*Целлюлозно-бумажная промышленность* сбрасывает в воду целлюлозное волокно и растворённые органические вещества: углеводы, смолы, жиры. Все они легко окисляются, что приводит к эвтрофикации водоёмов.

*Металлургическая промышленность* способствует отравлению тяжёлыми металлами. Например, в Японии наблюдалось массовое отравление кадмием, причиной которого послужили сточные воды кадмиевого рудника, использовавшиеся для орошения рисовых полей.

4 Сельское и лесное хозяйства. Удобрения и пестициды, применяемые для повышения урожайности смываются в водоёмы. Например, различные пестициды для борьбы с вредными насекомыми (инсектициды), сорняками (гербициды), с водной растительностью (альгициды) и для других целей. Ежегодно во всём мире применяется свыше 1 млн тонн пестицидов. Одновременно увеличивается выработка и применение в больших количествах химических удобрений. Все эти вещества поступают в водоёмы и являются одним из основных источников их загрязнения. Происходит это не только в результате сброса в водоёмы сточных вод предприятий, вырабатывающих эти вещества, и в результате прямого попадания ядохимикатов в водоёмы при разбрызгивании и распылении их с самолётов, но и вследствие смыва их дождевыми водами с поверхности почв, деревьев, кустарников, трав и т.д.

Животноводство связано с образованием больших масс мёртвой органики (навоз, подстилки), мочевины, которые оказываются в водных объектах. Эти отходы не ядовиты, но их массы огромны и они ведут к тяжёлым последствиям для водных экологических систем (эвтрофикации водоёмов).

Систематический многолетний сплав леса на ряде водоёмов также является одним из источников загрязнения водоёмов. Под его воздействием водоемы засоряются отходами лесосплава, ухудшаются физико-химические свойства воды и биологический режим.

5. Радиоактивные вещества являются мощным источником загрязнения водоёмов, в связи с широким использованием атомной энергии в различных отраслях народного хозяйства и захоронением радиоактивных отходов. Радиоактивные загрязнения очень стойки и опасны для живых организмов. При поступлении их в водоём возникает загрязнение не только воды и грунтов, но и всей флоры и фауны.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое загрязнение водоемов?
2. Какие причины загрязнения водоемов Вы знаете?
3. Какими показателями определяют качество вод рыбохозяйственных водоемов?
4. Какие существуют группы загрязняющих веществ?
5. Что такое естественное загрязнение водоемов?
6. Что такое антропогенное загрязнение водоемов?

## **1.5 САПРОБНОСТЬ ВОДОЁМОВ**

**Цель занятия.** Изучить сапробность и зоны сапробности водоемов. Изучить организмы-индикаторы загрязнения водоемов.

### **Сапробность водоемов. Зоны сапробности.**

Сапробность – обсемененность воды организмами, способными обитать в загрязненных органическими веществами водах.

Сапробные организмы - организмы, обитающие в загрязненных водах.

Система сапробности – система биологического анализа качества вод, созданная немецкими учеными ботаником Рихардом Кольквицем (1873-1956) и зоологом Максимилианом Марсоном (1845-1909).

Большой вклад в дальнейшее развитие и обоснование системы сапробности внесли ученые Г. И. Долгов, Я. Я. Никитинский, А. С. Разумов, Н. С. Строганов и ряд других. Особенно значителен их вклад в исследовании индикаторных организмов в поверхностных и сточных водах, и главным образом, в очистительных сооружениях.

Оценка степени загрязнения водоемов основывается на учете количества присутствующего в воде органического вещества разных форм. Система сапробности не является универсальной, она отражает только часть вариантов, встречающихся в природных, сточных водах и касается таких вод, в которых присутствующие органические вещества влияют на качество воды и, прежде всего, на кислородный режим.

Р. Кольквитц и М. Марсон установили 3 зоны сапробности:

1) Полисапробная зона характеризуется наличием в воде неразложившихся белков, присутствием значительного количества сероводорода, углекислого газа, метана, аммиака, обилием сложных биохимических соединений, а свободный кислород почти отсутствует. Основу населения составляют сапрофитные бактерии,

численность которых достигает многих сотен миллионов клеток в 1мл воды. Многочисленны бесцветные жгутиковые и грибы. Из более высоко организованных форм здесь встречаются олигохеты (*Tubifex tubifex*) и личинки мух (*Eristalis tenax*). Число видов, обитающих в полисапробной зоне, невелико, но развиваются они в огромных количествах.

2) Мезосапробные зоны. Загрязнение выражено слабее: неразложившихся белков нет, сероводорода и углекислого газа немного, кислород присутствует в заметных количествах. Различают  $\alpha$ - и  $\beta$ -мезосапробные зоны:

$\alpha$ -мезосапробная зона. По характеру биохимических процессов близка к полисапробной. В воде в больших количествах содержится аммиак, amino- и амидокислоты. Основную группу составляют сапрофитные бактерии, количество которых достигает нескольких десятков миллионов клеток в 1мл воды. Большое распространение имеют бесцветные жгутиковые, микроскопические грибы, инфузории, встречаются коловратки, некоторые представители зеленых и сине-зеленых водорослей. В донных осадках в больших количествах обитают олигохеты (сем. *Tubificidae*) и личинки комаров (*Chironomus plumosus*).

$\beta$ -мезосапробная зона. Преобладают окислительные процессы над восстановительными. Благодаря интенсивному фотосинтезу многочисленных растений летом воды бывают перенасыщены кислородом. Преобладают аммонийные соединения, нитриты и нитраты (продукты минерализации органических веществ). Содержание органических веществ ничтожно. Население отличается большим видовым разнообразием. Численность сапрофитных бактерий составляет 20-30 млн. клеток в 1мл воды. В водах этой зоны многочисленны коловратки, низшие ракообразные, насекомые, моллюски и рыбы.

3) Олигосапробная зона. Эта зона полностью свободна от загрязнений и обычно перенасыщена кислородом. Сероводород отсутствует, углекислого газа мало, достаточное количество кислорода, растворенных органических веществ практически нет. Население наиболее разнообразно в видовом отношении, но количественно значительно беднее, чем в предыдущих зонах. Выделяют катаробные воды, в которых количество растворенного кислорода выше нормального, углекислого газа и сероводорода нет. Катаробные воды - наиболее чистые грунтовые, минеральные воды или вода, которая была искусственно подготовлена в качестве питьевой.

**Организмы - индикаторы загрязнения.** Организмы-индикаторы – организмы, характерные для зон различной сапробности.

Каждой зоне сапробности свойственны специфические группы организмов, т.к. они характеризуются определенными физико-химическими свойствами. Одни виды развиваются только в загрязненных, полисапробных зонах, другие могут существовать лишь в чистых, богатых кислородом водах.

Различное отношение гидробионтов к степени загрязнения водоема обуславливается двумя основными причинами:

1) потребностью организма в органических веществах как в пище;

2) способностью существовать в загрязненных водах (степенью выносливости организмов).

Первые списки организмов-индикаторов были составлены Кольквитцем и Марсоном. К настоящему времени число таких животных и растений превышает 3000 видов. Индикаторная роль гидробионтов характеризуется не только фактом

нахождения или отсутствия их в водоеме, но и степенью количественного развития, вследствие чего характеристика сапробности вод должна даваться с учетом не только видового состава организмов, но также их численности и биомассы.

Система оценки загрязнения водоемов по степени сапробности недостаточна, т.к. не учитывает присутствия в воде токсических веществ. В связи с этим целесообразно оценивать загрязнения водоемов по трем показателям: по степени сапробности; по степени токсобности; по степени сапротоксобности.

*Токсобность* - свойство организмов существовать в водах, содержащих токсические вещества, использовать часть этих веществ себе в пищу или сорбировать на поверхности (внутри) своего тела. Водоемы, или их зоны, загрязненные в такой степени, что существование гидробионтов исключается полностью, обозначаются как гипертоксобные.

Показателями *полисапробных зон* являются нитчатые бактерии (*Sphaerotilus natans*, *Triolysococcus ruses* и др.), грибы и простейшие, развивающиеся при сильном органическом загрязнении и образующие слизистые обрастания.

К индикаторам *α-мезосапробных зон* относятся некоторые виды синезеленых водорослей (*Oscillatoria*), простейшие (*Cladomonas fruticulosa*, *Podophrya*), коловратки (*Brachionus plicatilis*, *Philodina*), личинки двукрылых (*Chironomus plumosus*, *Culex pipiens*, *Eristalis tenax*).

К индикаторам *β-мезосапробной* зоны относятся простейшие (*Tintinidium flaviatile*), коловратки (*Keratella cochlearis*), личинки двукрылых (*Endochironomus*, *Polipedium*), а из растений – ряска малая и тредольная, роголистник темно-зеленый.

Индикаторами *олигосапробных зон* являются водоросли (*Melosira italica*, *Draparnaldia glomerata*), коловратки (*Notholea longispina*), ветвистоусые рачки (*Daphnia longispina*), личинки паденок и веснянок, моллюск *Dreissena polymorpha*, стерлядь, голянь и форель.

По отношению к степени загрязнения вод органическими веществами у организмов наблюдается значительная экологическая пластичность. Поэтому гидробионты, как индикаторы, используются при массовом их развитии в водоеме.

Организмы-показатели токсобного и сапротоксобного загрязнения изучены очень слабо. Известны немногие виды, способные выдерживать высокие концентрации токсических веществ. Например, личинки некоторых двукрылых способны развиваться при концентрации хрома до 25 мг/л, меди – до 2,2 мг/л, цианидов – до 3,2 мг/л.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое сапробность?
2. Какие существуют зоны сапробности?
3. Кто впервые установил зоны сапробности?
4. Какие различают организмы-индикаторы загрязнения водоемов?
5. Кем были составлены первые списки организмов-индикаторов?



## 1.6 ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ НАБЛЮДЕНИЙ И КОНТРОЛЯ НАД ЗАГРЯЗНЕНИЕМ ВОДОЕМОВ

**Цель занятия.** Изучить цели и задачи системы наблюдений и контроля над загрязнением морских вод и устьев рек (СКЗМ). Изучить требования к выбору районов и станций наблюдений. Изучить принципы деления станций наблюдений по категориям. Изучить организацию наблюдений и рекогносцировочные обследования.

### **Цель и задачи системы наблюдений и контроля над загрязнением морских вод и устьев рек (СКЗМ)**

СКЗМ - сетки станций наблюдений, состоящие из стандартных гидролого-гидрохимических разрезов, вековых разрезов, рейдовых пунктов, а также гидростворов в водотоках дельты. Эти наблюдения позволяют проводить и систематически уточнять распространение загрязняющих веществ по степени и пространственному расположению в морях и устьях рек.

Цель системы наблюдения - получение информации о состоянии загрязнения водоёмов для обеспечения народнохозяйственных организаций, а также для планирования и осуществления мероприятий по охране и рациональному использованию водных объектов.

Основными задачами СКЗМ является обеспечение:

- штормовой (экстренной) информацией о резких повышениях или высоких уровнях загрязнения (особо опасных и опасных явлениях);
- систематической информацией о состоянии загрязнения ;
- эпизодической информацией о состоянии загрязнения (осуществляется по отдельным запросам).

Системы наблюдений и контроля обеспечивают:

- штормовой, систематической и эпизодической информацией об уровнях загрязнения исследуемых водоёмов;
- составление баланса, прогнозов и предупреждений о возможных изменениях загрязнения морской среды, а также влияния химических загрязнений на трансформацию химического состава вод;
- эффективность мероприятий по защите от загрязнения морской среды;
- изучение процессов деструкции загрязняющих веществ;
- планирование и осуществление мероприятий по охране и рациональному использованию водоёмов.

**Требования к выбору районов и станций наблюдений.** Требования, предъявляемые к выбору районов и расположению станций наблюдения, определяются совокупностью условий:

- характером требуемой информации (штормовая, систематическая, эпизодическая);
- значением района наблюдений (курортно-оздоровительное, рыбохозяйственное);
- назначением информации (прослеживание изменений загрязнений во времени, изучение пространственного распространения, составление баланса и прогноза загрязнений);
- географическим расположением источников загрязнений;

- составом и концентрацией загрязняющих веществ;
- предшествующим состоянием загрязненного моря или его отдельных районов;
- физико-географическими и гидролого-гидрохимическими условиями.

Общим требованием, предъявляемым к расположению станций наблюдений служит их репрезентативность (показательность), а также охват наблюдениями как загрязненных, так и относительно чистых вод.

Для получения *штормовой информации* важным является выбор района наблюдений. Чаще всего этими районами являются прибрежные воды, где осуществляется максимум сброса сточных вод, а также прибрежные воды, имеющие важное курортно-оздоровительное и рыбо-хозяйственное значение.

Для получения *систематической информации* необходимо получение наблюдений по всей акватории моря. Частота и расположение станций наблюдений определяется в прибрежных водах объемом и характером поступающих стоков и гидролого-химическими условиями, в открытой части – в основном циркуляционными системами.

Для получения *эпизодической информации* наблюдения проводятся в локальных районах при обследовании шельфовой зоны\* во время изыскательских работ.

\*Шельфовая зона – продолжение материка под океаном у побережья.

Сетка станций наблюдений должна начинаться от источников загрязняющих веществ (устья рек, города, поселки, промышленные комплексы, предпроливные районы) и заканчиваться в относительно чистых или слабо загрязненных районах (это обычно удаленные от берега открытые районы моря). Она должна охватывать всю акваторию моря, значительную его часть или прибрежную зону. При определении местоположения станций наблюдений за загрязняющими веществами необходимо учитывать их распространение, объем сбросов, скорость деструкции, форму их нахождения в естественных условиях и физико-химические свойства.

Например, ртуть встречается локально в отдельных загрязненных районах моря, приуроченных к районам сброса, а также в стрезнях циркуляционных систем. Локальное распространение ртути связано со сравнительно небольшими объемами ее сброса, быстрой коагуляцией и выпадением на дно соединений ртути при солёности ниже 10%. Нефть распространена практически повсеместно. Это связано, во-первых, со значительными объемами ее сброса, во-вторых, с тем, что все углеводороды разлагаются чрезвычайно медленно, и, в-третьих, с тем, что наличие скачка плотности значительно препятствует осаждению тяжелых фракций нефти в нижние слои моря и на дно.

**Принципы деления станций наблюдений по категориям.** Станции наблюдений разделяются на три категории. В основу деления положены важность района и уровень загрязнения водного объекта в районах поступления сточных вод. Также категория станций также определяется срочностью, объемом наблюдений, количеством определяемых загрязняющих ингредиентов и показателей среды.

Станции I категории - единичные контрольные станции, характеризуют обычно ограниченные участки. Они располагаются в районах, постоянно подверженных интенсивному загрязнению, и имеющих большое оздоровительное и рыбохозяйственное значение (порты и припортовые акватории, места сброса сточных вод, районы переработки и добычи полезных ископаемых, районы курортов, промысла, нереста рыбы и т.п.). Станции I категории предназначены для оперативного контроля

над состоянием загрязнения моря в районах курортов, рыбных промыслов и для выявления высоких уровней загрязнения моря в местах поступления сточных вод.

Станции II категории - сетка станций, охватывает значительные акватории моря, устья рек и другие районы, имеющие большое хозяйственное значение (курортные зоны, рыбопромысловые районы и районы, где поступают и могут распространяться сточные воды), также на трассах интенсивного судоходства. Эти станции предназначены для получения штормовой и систематической информации в целях контроля загрязнения водоёмов и исследования сезонной и годовой изменчивости.

Станции III категории располагаются в части моря, где не предусмотрены станции I и II категорий и где отмечаются низкие уровни загрязнения или относительно чистые воды. Станции III категории предназначены для получения систематической информации об уровнях загрязнения с целью изучения их сезонной и годовой изменчивости и для определения элементов баланса химических веществ.

Категория станций. При определении категории станций наблюдений учитывают состояние загрязнения района наблюдений и может корректироваться в зависимости от динамики уровней загрязнения морской среды, а также в связи с повышением новых объектов контроля. В случае необходимости возможно изменение местоположения и категории станций.

**Организация наблюдений.** Наблюдения за загрязнениями и химическим составом вод проводится по сокращенной или полной программе в зависимости от категории станции.

*Сокращенная программа.* Сроки наблюдений: один раз в декаду (в середине каждой декады). Состав наблюдений: нефтепродукты, растворенный кислород, рН и один-два загрязняющих ингредиента, характерные для района наблюдений. Одновременно проводятся визуальные наблюдения за состоянием загрязнения поверхности моря. Горизонты отбора проб:

- при глубине до 3м проба отбирается с одного горизонта (поверхность);
- при глубине до 10м – с двух горизонтов (поверхность и у дна);
- при глубине до 25м – с трех горизонтов (поверхность, 10м, и у дна).

*Полная программа.* Сроки наблюдений: один раз в месяц (в середине месяца). В этом случае наблюдения по сокращенной программе во второй декаде не проводится. Состав наблюдений:

– загрязняющие вещества (нефтепродукты, хлорорганические пестициды, тяжелые металлы, фенолы, детергенты, а также загрязняющие ингредиенты, специфические для данного района).

– показатели среды (растворенный кислород; сероводород  $H_2S$ ; концентрация водородных ионов рН; нитритный азот  $NO_2$ ; нитратный азот  $NO_3$ ; аммонийный азот  $NH_4$ ; общий азот, фосфор фосфатный, общий фосфор, кремний).

– элементы гидрометеорологического режима (соленость, температура воды и воздуха, скорость и направление течений и ветра, прозрачность, цвет).

Горизонты отбора проб такие же, как и при сокращенной программе.

При организации наблюдений за концентрацией загрязняющих веществ необходимо учитывать следующие обстоятельства:

- независимость формирования стока загрязняющих веществ от формирования речного стока, поэтому наблюдения за их концентрациями должны быть систематическими в течение всего года;

- возможность пространственно-временной разрывности полей загрязняющих веществ по длине рукава с уменьшением их концентрации до 1 ПДК и ниже, поэтому систематические наблюдения должны проводиться достаточно часто.

При организации наблюдений за контролем загрязняющих веществ на замыкающем гидростворе устьевой области реки руководствуются следующими правилами:

-при ширине реки до 50м, проба воды отбирается на одной вертикали (на стрежне);

-при ширине 50-500м – на трех вертикалях,

-при ширине 500-1000м – на четырех вертикалях; при ширине >1000м – на пяти вертикалях.

Средняя концентрация загрязняющего вещества определяется как средняя взвешенная величина из концентраций на всех горизонтах и вертикалях.

Приток (или отток) загрязняющих веществ при водообмене рассчитывается аналогичным образом. При анализе годовой характеристики притока и оттока загрязняющих веществ указываются месяцы (сезоны, годы) с минимальным, максимальным притоком загрязняющих веществ и причины этих явлений: увеличение (уменьшение) загрязнения смежной акватории, увеличение сброса загрязняющих веществ, введение в строй новых очистных сооружений, аномальные гидрометеорологические условия, аварийные ситуации.

Частота проведения наблюдений на станциях:

На станциях I категории наблюдения проводятся по сокращенной программе два раза в месяц (в первой и третьей декадах), по полной программе – один раз в месяц (во второй декаде).

На станциях II категории наблюдения проводятся по полной программе один раз в месяц (во второй декаде). В период ледостава (неподвижный ледяной покров) наблюдения проводятся один раз в квартал.

На станциях III категории наблюдения проводятся по полной программе один раз в квартал.

Внеочередные наблюдения проводятся в трех случаях:

1) когда, отмечено увеличение содержания какого-либо загрязняющего вещества в 10 и более ПДК (предельно допустимая концентрация), что относится к опасным (ОЯ) или особо опасным явлениям (ООЯ);

2) когда, получена информация о катастрофических разливах загрязняющих веществ или их залповых сбросах; о массовой гибели рыбы или других морских животных;

3) когда, по визуальным наблюдениям выявлено покрытие не менее одной трети поверхности прибрежной части моря и береговой полосы нефтяной или масляной пленкой.

Цели внеочередных наблюдений:

– установление пространственного распространения загрязняющих веществ;

– определение динамики и снижения уровней загрязнения до фоновых в результате процессов самоочищения и перемешивания;

– передача штормовой информации в соответствии с инструкцией.

Если известны источник и канал поступления загрязняющих веществ, то наблюдения организуются на сетке станций, охватывающей весь район загрязнения. В связи с этим устанавливаются программы дальнейших наблюдений.

Программа наблюдений:

А) Состав наблюдений. В состав наблюдений входят загрязняющие вещества, вызывающие ОЯ (опасные явления) или ООЯ (особо опасные явления), соленость, кислород, рН воды и стандартный комплекс гидрометеохарактеристик. В случае загрязнения поверхности моря рекомендуются визуальные авианаблюдения. Одновременно проводятся наблюдения с берега или корабля.

Б) Размещение сетки станций наблюдений. После первой полной съемки сетка станций наблюдений должна быть сокращена до трех станций на каждом разрезе (одна у берега, вторая в зоне максимальных концентраций загрязняющего вещества, третья – за внешней границей зоны высокого загрязнения).

В) Частота наблюдений и отбора проб. Рекомендуется проводить наблюдения и отбирать пробы через каждые 5 суток до момента снижения концентраций загрязняющего вещества. Если высокие уровни загрязнения сохраняются продолжительное время (больше одного месяца), то внеочередные наблюдения прекращаются.

Все сведения о ОЯ и ООЯ помещаются в бюллетени, обзоры и справки о состоянии загрязнения моря (района) и используются для расчета концентрации загрязняющих веществ.

**Рекогносцировочные обследования.** Рекогносцировка (нем. *Rekognoszierung*, от лат. *Recognosco* - осматриваю, обследую) предварительное обследование местности для каких-либо специальных работ.

Для выбора местоположения станций необходимо предварительно провести рекогносцировочные обследования. Рекогносцировочные наблюдения начинаются с подробного изучения материалов по характеристике гидрологического режима водного объекта, источников загрязнения, условий, при которых наблюдались аварийные сбросы загрязняющих веществ. В районе, подлежащем изучению, организуется съемка на станциях разрезов. Основной разрез начинается у источников загрязнения, направлен в море и оканчивается за пределами загрязнений. Параллельно основному разрезу слева и справа от него проводятся еще два разреза. Система разрезов образует сетку станций.

Наблюдения должны отражать состояние загрязнения вод при характерных для каждого района гидрометеоусловиях (сгоне или нагоне, минимуме или максимуме стока, приливе или отливе). При равномерном режиме сброса сточных вод рекогносцировочные наблюдения необходимо проводить один-два раза в сезон.

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Что такое СКЗМ, какова цель и задачи системы наблюдений?
2. Каким требованиям должны отвечать станции наблюдений при выборе района и расположения?
3. Что необходимо для получения штормовой, систематической и эпизодической информации?
4. Как должна располагаться сетка станций наблюдений?
5. Какие существуют программы наблюдений за загрязнениями и химическим составом вод?
6. Что такое рекогносцировочные обследования?

## 1.7 ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ И ИЛА. ТИПЫ И МЕТОДЫ

**Цель занятия.** Изучить приборы, используемые при отборе проб воды и ила. Ознакомиться с оборудованием, необходимым для отбора проб. Изучить типы отбора проб.

**Оборудование и материалы:** «тростниковые ножницы»; батометры; водяные грабельки трех- и шестизубовые, двусторонние; дночерпатели: коробочный, ковшовый, трубчатый; драги; емкости: бутылки: стеклянные, пластмассовые; одноразовая посуда, кружки, ведра и т.п.; зарослечерпатели; коса; насосы для отбора проб растворенных газов; нож; пинцеты; планктонночерпатели; планктонные сети; предметные стёкла; пробоотборники: стержневой, автоматические времязависящие и объёмозависящие; рамы различных типов; рупор (маска для аквалангистов); сачки; скальпель; скребки; смотровые трубы; трал; черпак; якорьки-кошки. Батометры, стратометры, плакаты.

**Общие сведения.** Существование гидробионтов и микроорганизмов, обитающих в водоеме, зависит от экологических параметров окружающей среды. Основными факторами, определяющими их развитие является распределение температуры, проникновение света, соленость, количество растворенного органического вещества, сульфатов, сероводорода, железа, марганца, усвояемых форм азота, растворенного кислорода и др.

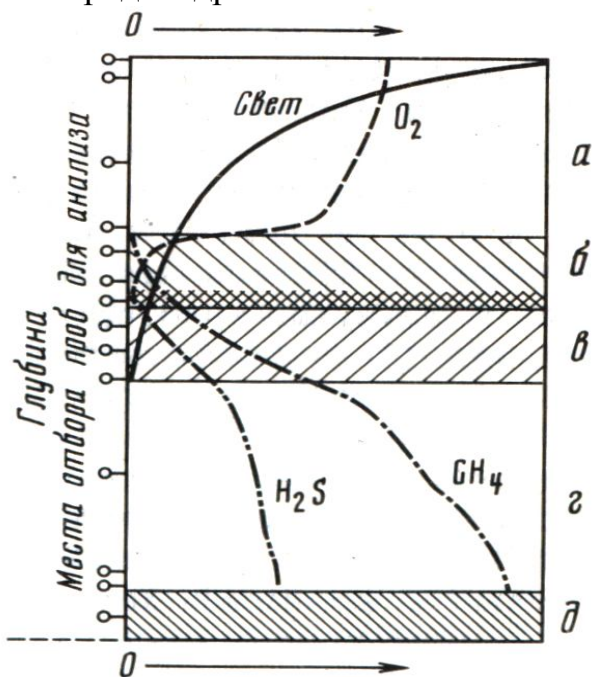


Рис. 1 Места отбора проб воды для анализа по экологическим зонам в эвтрофном озере\*: а — эпилимнион; б — слой температурного скачка; в — освещенная зона гипolimниона; г — темная зона гипolimниона; д — зона иловых отложений.

В водоемах различают следующие экологические зоны (рис. 1):

а) эпилимнион - верхний слой воды с массовым развитием фитопланктона;

б) слой температурного скачка, где задерживаются оседающие частицы отмерших микроорганизмов;

в) освещенная зона гипolimниона - нижняя граница температурного скачка и проникновения кислорода, где возможно массовое развитие различных физиологических и экологотрофических групп бактерий;

г) темная зона гипolimниона, где распространены анаэробные бактерии и часто встречаются бактерии с газовыми вакуолями;

д) зона иловых отложений.

В зависимости от трофики водоема может меняться и расположение экологических зон в озерах. Об этом сразу можно судить по вертикальному распределению температуры, растворенного кислорода и сероводорода. Ориентируясь на эти показатели, отбор проб для химического и бактериологического анализа производится с

поверхности, в слое температурного скачка — через 0,2—0,5 м в зависимости от его мощности, в гипolimнионе — реже, в зависимости от глубины водоёма, и из поверхностного слоя ила.

\*Эвтрофное озеро – хорошо прогреваемое, обычно неглубокое, богатое питательными веществами и планктоном озеро.

### **Оборудование для отбора проб**

Для отбора проб воды применяют батометры, а для отбора проб ила дночерпатели и стратометры.

Батометр - гидрологический прибор для взятия проб воды с различных глубин водоёма.

Дночерпатель — это прибор, который предназначается для взятия проб грунта со дна водоемов.

Стратометр – прибор, которым можно с лодки вырезать в грунте дна пробу в виде длинного столбика.

### **Батометры для взятия проб воды с различных глубин водоёма**

**Батометр Паталаса** (рис. 2) предназначен для взятия проб воды со взвешенными наносами. Батометр состоит из однолитровой колбы с верхней и нижней вставками. На вставках размещены крышки, поверхности которых притёрты с поверхностями вставок. Отбор проб воды производится путём опускания прибора. В момент движения вниз, крышки поднимаются, и столб воды проходит через трубу. На нужной глубине движение прекращается, и вода внутри трубы запирается самопроизвольно падающими крышками. Прибор изготавливается в двух вариантах: 1. утяжелённый, с трубой из нержавеющей стали; 2. облегчённый, с трубой из органического стекла.



**а-утяжелённый,  
с трубой из нержавеющей стали**



**б-облегчённый,  
с трубой из органического стекла**

**Рис. 2 Батометр Паталаса**

**Батометр ГР-16М** (рис. 3) предназначен для взятия проб воды с взвешенными наносами при длительном наполнении. Представляет собой стеклянную 1л бутылку с металлической головкой, через которую проходят заборная и воздухоотводная трубки.

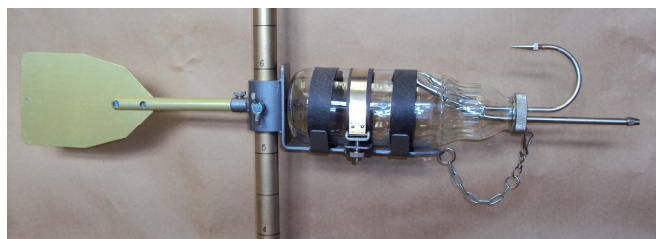


Рис. 3 Батометр ГР-16М

**Батометр Руттнера** (рис. 4) предназначен для отбора проб воды (до 0,5-3 л.) в озерах и водохранилищах. Металлические детали в резервуаре полностью изолированы органическим покрытием, что устраняет коррозионные и теплохимические реакции. Применяется при исследовании микроэлементного состава придонных вод.

**Планктобатометр ПБ-5 и ПБ-10** (рис. 5) служит для взятия водных и зоопланктонных проб с плавсредств (5л или 10л), оборудованных подъемными устройствами.



Рис. 4. Батометр Руттнера



Рис. 5 Планктобатометр

**Пробоотборник ПЭ-1110** (рис. 6) предназначен для взятия проб воды мелководных водоемов. Пробоотборник представляет собой груз во фторопластовой оболочке с отверстиями для воды, в который через переходное кольцо ввинчивается пробоотборная бутылка. Расположение груза над бутылкой позволяет вести отбор проб в мелководных водоемах. Ручка, ввинчиваемая в крышку груза, исключает опрокидывание системы при погружении. После заполнения емкости водой пробоотборник поднимается на поверхность, бутылка с пробой вывинчивается из системы, закрывается крышкой и доставляется в лабораторию.

**Батометр-бутылка ГР-15 в грузе** (рис. 7) предназначен для отбора проб воды, содержащей взвешенные вещества. Представляет собой однолитровую бутылку с грузом рыбовидной формы. Скорость течения воды не должна превышать 2,5 м/с.

**Батометр Молчанова ГР-18** (рис. 8) предназначен для взятия проб воды с различных глубин водоема с одновременным измерением температуры воды. Погружение прибора производится с лодки, понтона или катера. Прибор опускается на заданную глубину (до 40 м) на тросе с применением любой гидрометрической лебедки. Для измерения температуры воды в каждом цилиндре установлен термометр. Слив воды производится через краны, находящиеся в нижних крышках цилиндров.



Рис. 6 Пробоотборник ПЭ-1110



Рис. 7 Батометр-бутылка ГР-15 в грузе

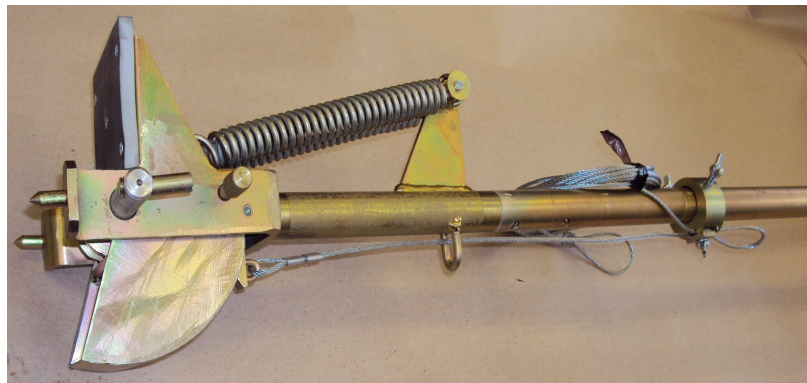


Рис. 8 Батометр Молчанова ГР-18



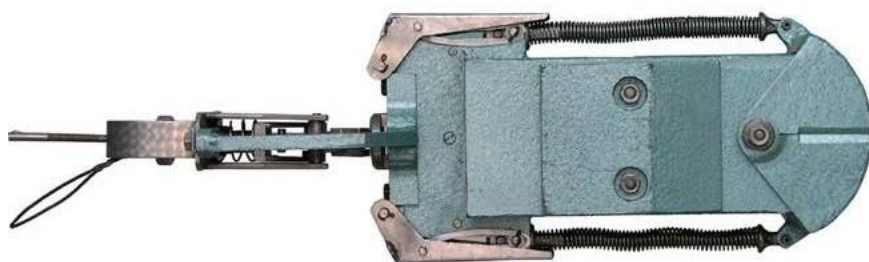
### **Дночерпатели и стратометры, для взятия проб грунта со дна водоемов**

**Дночерпатель штанговый ГР-91** (рис 9) предназначен для взятия проб илистых и песчано-гравелистых донных отложений со дна рек и каналов глубиной до 3 метров и скоростью течения воды до 2 м/с, и озер и водохранилищ глубиной до 4 метров. Объем ковша не менее 300 см<sup>3</sup>.



**Рис. 9 Дночерпатель штанговый ГР-91**

**Дночерпатель автоматический коробчатый (ДАК-100, ДАК-250, ДАК-400)** (рис. 10) предназначен для взятия донных проб в пресноводных водоемах на грунтах различной плотности с любых плавсредств. (ДАК-100 площадь пробы грунта 1/100 м<sup>2</sup>; ДАК-250 площадь пробы грунта 1/40 м<sup>2</sup>; ДАК-400 площадь пробы грунта 1/25 м<sup>2</sup>).



**Рис. 10 Дночерпатель автоматический коробчатый (ДАК)**

**Дночерпатель стратификационный (ДЧС-100, ДЧС-250)** (рис. 11) предназначен для изучения вертикального распределения организмов бентоса в толще грунта путем послойной отсечки грунта толщиной 30 мм. (ДЧС-100 площадь пробы грунта 1/100 м<sup>2</sup>; ДЧС-250 площадь пробы грунта 1/40 м<sup>2</sup>).



**Рис. 11 Дночерпатель стратификационный (ДЧС)**

*Дночерпатель Заболоцкого штанговый коробчатый* (рис. 12) предназначен для количественного учета макробентоса и микробентоса в мелководных зонах водоемов с глубиной до 2,5 метров, опускается на штанге. Площадь пробы -  $1/40 \text{ м}^2$ .

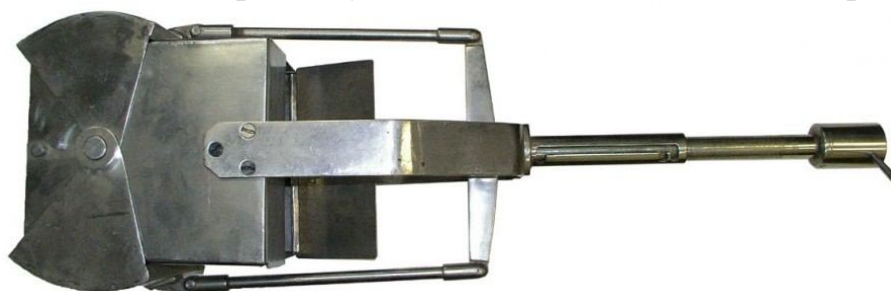


Рис. 12 Дночерпатель Заболоцкого штанговый коробчатый

*Дночерпатель штанговый трубчатый* (рис. 13) предназначен для количественного учета макробентоса и микробентоса в мелководных зонах водоемов с глубиной до 2,5 метров, опускается на штанге. Высота столба грунта 300 мм, диаметр вырезанного столба 80 мм.



Рис. 13 Дночерпатель штанговый трубчатый

*Микробентометр С-1* (рис. 14) предназначен для сбора и количественного учета придонных и донных микроскопических животных (фитобентоса) на глубинах 2,0-2,5 м. Основная часть микробентометра С-1 - металлическая трубка длиной 25-30 см с внутренним диаметром 4-5 см, на основании которого рассчитывают площадь внутреннего сечения трубки. На верхнем конце этой трубки находится втулка с конусообразной воронкой, в которую на рычаге герметически входит притертая крышка-клапан. Трубку с открытой крышкой на разборной деревянной штанге опускают на дно и врезают заточенным нижним концом в толщу донного грунта на несколько сантиметров. Потянув за веревку, закрепленную на свободном конце рычага, закрывают верхнюю втулку трубки крышкой, после чего прибор осторожно извлекают на поверхность. При выходе трубки из воды нижнее отверстие трубки закрывают ладонью, чтобы не допустить выпадения грунта. Открыв крышку, осторожно сливают верхние слои воды в стеклянную посуду до появления мути. Эту первую порцию воды, содержащую планктонные организмы, выливают за борт. Оставшиеся в трубке воду, ил и грунт легко встряхивают и переносят в приготовленную для пробы посуду, предварительно измерив ее объем. Диаметр вырезанного столба 34 мм.



Рис. 14 Микробентометр С-1

**Трубка ГОИН** (рис. 15) предназначена для сбора колонок (проб) грунта со дна различных водоёмов. Емкость трубки: ГОИН 1 м – 1700 см<sup>3</sup>; ГОИН 1,5 м – 2500 см<sup>3</sup>.



Рис. 15 Трубка ГОИН

**Дночерпатель бентосный номинального исполнения** (рис. 16) предназначен для сбора поверхностного слоя грунта со дна водоема. Глубина погружения не ограничена. Поверхностный слой грунта дночерпатель собирает при помощи скребков, стягиваемых тросом при подъеме дночерпателя. Площадь захвата грунта 0,025 м<sup>2</sup>

**Дночерпатель бентосный утяжеленный (из нержавеющей стали)** (рис. 17) предназначен для сбора поверхностного слоя грунта со дна водоема. Глубина погружения не ограничена. Поверхностный слой грунта дночерпатель собирает при помощи скребков, стягиваемых тросом при подъеме дночерпателя. Площадь захвата грунта 0,025 м<sup>2</sup>



Рис. 16 Дночерпатель бентосный номинального исполнения



Рис. 17 Дночерпатель бентосный утяжеленный

### **Оборудование для отбора точечных проб на определенной глубине**

Для отбора точечных проб на заданной глубине применяют батометры. Допускается отбор проб воды бутылкой. Бутылку закрывают пробкой, к которой прикреплен шнур, и вставляют в тяжелую оправу или к ней подвешивают груз на тросе (шнуре, веревке). Бутылку опускают в воду на заранее выбранную глубину, затем пробку вынимают при помощи шнура, бутылка заполняется водой до верха, после чего вынимается. Перед закрытием бутылки пробкой слой воды сливается так, чтобы под пробкой оставался небольшой слой воздуха.

Целесообразно применять специальные бутылки для отбора проб, например бутылки с откачанным воздухом. Пробу воды с небольшой глубины (особенно зимой) отбирают бутылкой, прикрепленной к шесту.

Для исследования вертикального профиля воды при ее слоистой структуре допускается применять стакан с делениями, пластмассовый цилиндр или цилиндр из нержавеющей стали, открытый с обоих концов. В точке отбора проб цилиндр перед поднятием на поверхность закрывают с обоих концов специальным устройством (управляющим тросом).

### **Оборудование для отбора проб донных отложений**

Отбор проб донных отложений проводят дночерпателями, соответствующими по их массе или способу действия залеганию нижнего слоя грунта.

Для отбора проб донных отложений с лодки или катера в зависимости от типа грунта применяют дночерпатели следующих моделей:

- коробочный дночерпатель;
- ковшовый дночерпатель.

Спуск и подъем облегченных моделей дночерпателей с площадью захвата  $1/40 \text{ м}^2$  выполняют с помощью механической лебедки или удерживая дночерпатель руками. Утяжеленные дночерпатели и дночерпатели с площадью захвата  $1/25 \text{ м}^2$  опускают с судна при помощи электрической лебедки.

Для отбора проб в прибрежных зонах водных объектов на глубине до 2,5 м применяют:

- дночерпатели, опускаемые на штанге (площадь захвата  $1/40 \text{ м}^2$ );
- трубчатый дночерпатель (площадь захвата  $1/250 \text{ м}^2$ ).

Выбор дночерпателя проводят в зависимости от места отбора проб, скорости движения воды, типа грунта и имеющегося лодочного оборудования.

Для исследования вертикального профиля донных отложений применяют стержневой пробоотборник.

Для проведения качественного анализа бентоса отбор проб проводят дночерпателями, скребками, драгами или тралами различной конструкции. Скребки применяют на мелководных участках водоема, драги - как на мелководных, так и на глубоких участках.

### **Автоматическое оборудование для отбора проб воды**

Применяют два основных типа автоматических пробоотборников - времязависящие и объемозависящие.

*Времязависящие пробоотборники* отбирают дискретные (отдельные, единичные), составные или непрерывные (целостные) пробы, но не учитывают различия в потоке.

*Объемозависящие пробоотборники* отбирают эти же типы проб с учетом различия в потоке.

Автоматические пробоотборники могут распределять пробы в емкости для отбора проб, изготовленные из различных материалов и содержащие различные вещества для консервации проб.

Инструментальные зонды, используемые для мониторинга или контроля потока рек, могут использоваться для приведения в действие автоматического оборудования для отбора проб.

Для отбора больших объемов воды применяют автоматизированную систему, которая позволяет на месте определять концентрацию контролируемого показателя.

### **Оборудование для отбора проб микробиологических показателей воды**

Для большинства проб пригодны стерилизованные бутылки из стекла или одноразовая посуда из полимерных материалов. Для отбора проб на глубине (например, в озерах или водохранилищах) применяют батометры. Батометры должны быть изготовлены из материала, выдерживающего суховоздушную или паровую стерилизацию.

Вся используемая аппаратура, включая насосы и насосное оборудование, должна быть свободна от загрязнений (промыта) и не должна дополнительно вносить новые микроорганизмы.

### **Оборудование для отбора проб радиологических показателей воды**

Пробы отбирают в стеклянные или пластмассовые бутылки, предварительно очищенные моющим средством, разбавленным азотной кислотой и тщательно промытые водой.

### **Оборудование для отбора проб растворенных газов (летучих веществ) в воде**

Пробы, пригодные для правильного определения растворимых газов, должны быть получены только с помощью оборудования, которое собирает пробы перемещением воды быстрее, чем перемещение воздуха из пробоотборника.

Если для отбора проб растворенных газов используют насосы, то необходимо, чтобы вода накачивалась под давлением, которое не должно опускаться значительно ниже атмосферного давления. Пробу закачивают непосредственно в хранилище или емкость.

Допускается отбирать пробы для определения растворенного кислорода, используя бутылку или черпак. При этом следует учитывать, что концентрация растворенного кислорода из-за контакта между пробой и воздухом изменяется в зависимости от степени насыщения воды газом.

При отборе пробы в бутылки из крана или насоса гибкая инертная трубка, по которой поступает вода, должна доходить до дна бутылки для обеспечения наполнения жидкостью от дна бутылки.

Сбор проб растворенного кислорода из воды, покрытой льдом, выполняют так, чтобы предотвратить влияние воздуха на пробу.

### **Оборудование для отбора биологических проб**

*Фитопланктон* - совокупность микроскопических растений (главным образом водорослей), обитающих в толще морских и пресных вод и пассивно передвигающихся под влиянием водных течений.

Для отбора проб фитопланктона используют:

- батометры;
- планктонные сети.

При использовании сети на мелководье применяют буксирование за лодкой, на глубоких местах - тотальный лов от дна к поверхности.

*Зоопланктон* - совокупность животных, обитающих в толще воды морских и пресных водоемов и не способных противостоять переносу течениями.

Отбор проб зоопланктона проводится следующими методами:

- методы, представляющие комбинацию водозачерпывания и одновременного отделения планктона от воды в самой воде с помощью планктонных сетей, планктоночерпателей;

- методы, представляющие комбинацию отдельного водозачерпывания и последующего отделения от воды, что осуществляется фильтрацией через сетку или отстаиванием.

Метод отбора проб зависит от типа водоема, его глубины и размеров.

Для качественного сбора зоопланктона применяют планктонные сети различных конструкций, используемые с лодок, плота, судна, опуская вручную или с по-

мощью лебедки. Маленькие планктонные сети можно забрасывать с берега, не допуская зачерпывания грунта.

Для количественного сбора зоопланктона в зависимости от цели исследований применяют:

- количественные сети;
- батометры;
- емкости (кружки, ведра и т.п.).

*Перифитон* - сообщество организмов, населяющих живые и неживые субстраты под водой, в том числе вводимые человеком (подводные части кораблей, плотов, свай и т. д.). Термин ввел А. Л. Беннинг (1924). Отбор проб перифитона проводят двумя методами:

- отбор проб с естественных субстратов;
- отбор проб с помощью искусственных субстратов.

Отбор проб с естественных субстратов проводят с помощью скребков, ножа, скальпеля, пинцета или столовой ложки с заточенным краем.

Отбор проб с искусственных субстратов проводят с помощью предметных стекол. Стекла укрепляют вертикально, в текучих водоемах параллельно течению во избежание оседания детрита\*, грязи, мусора и т.п. Стекла вставляют в пенопластовые поплавки (резиновые пробки), поплавки надевают на трос. Длительность экспозиции определяется географическим положением, качеством воды изучаемого объекта, сезоном года, целью исследования, но не менее 14 сут.

\*Детрит - совокупность мелких (от нескольких мкм до нескольких см) неразложившихся частиц растительных и животных организмов или их выделений, взвешенных в воде или осевших на дно водоёма.

*Макрофиты* - растения сравнительно больших размеров (главным образом высшие водные растения), образующие ряд экологических группировок в водоеме:

1) макрофиты с плавающими листьями (кувшинка, кубышка, водокрас, рдест плавающий, сальвинил, ряска, водяной орех и др.);

2) надводные макрофиты (тростник, рогоз, аир, ежеголовник и др.);

3) подводные макрофиты (рдесты, элодея, роголистник, уруть и др.). Макрофиты определяют газовый режим водоемов за счет фотосинтеза. Для качественного отбора проб и зависимости от глубины воды используют следующее оборудование:

- водяные грабельки трех- и шестизубовые (при глубине воды не более 2-3 м);
- якорьки-кошки, двусторонние водяные грабли (при глубине более 2,5 - 3 м);
- мотки колючей проволоки с грузом;
- драги различных конструкций;
- смотровые трубы, изготовленные из металла, дерева и любого другого материала, или рупор (маску для аквалангистов).

Для количественного отбора проб дополнительно применяют рамы различных типов площадью 1; 0,5 и 0,25 м<sup>2</sup> и других размеров, квадратные, прямоугольные, круглые, изготовленные из дерева, алюминиевых или синтетических труб и других материалов с расчетом на их плавучесть.

Для отбора проб на фитомассу используют следующее оборудование:

- коса с лезвием длиной от пятки до конца 20 - 25 см, изготовленная из обыкновенной косы, у которой под углом срезают конец лезвия;
- зарослечерпатели (зарослевырезыватели) различных конструкций;

- «тростниковые ножницы».

*Макрозообентос* - это крупные донные животные (гребешок, морской еж, кукумария, морская звезда, креветки)\*.

Метод отбора выбирают в зависимости от ряда параметров: глубины воды, течения потока, вида объекта отбора и т.п.

Для отбора проб применяют сачки, скребки, дночерпатели или тралы и другие способы сбора.

\* Крупные донные животные

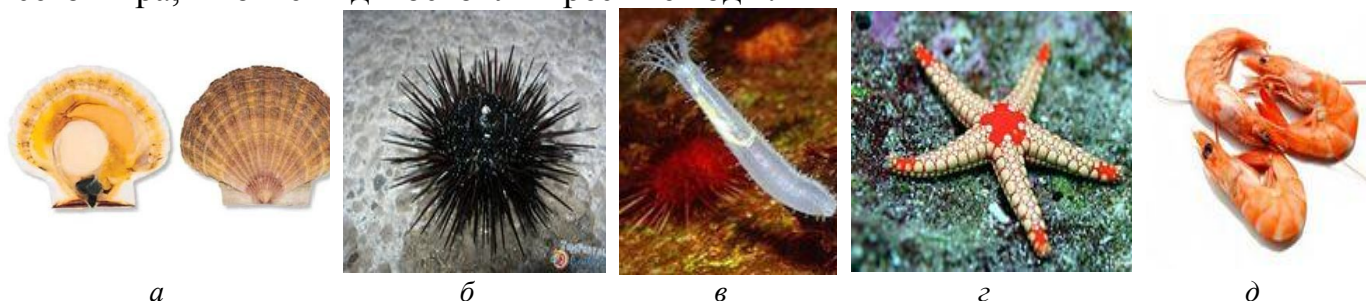
Гребешок (лат. Pecten), рис. 18а - род морских беспозвоночных животных класса двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*). Раковина округлая с прямым замочным краем. Поверхность её покрыта расходящимися от вершины радиальными ребрами.

Морской еж (лат. Echinoidea), рис. 18б — класс иглокожих, это сферической, сердцевидной или плоской формы, без рук, с кожным скелетом (панцирем), состоящим из известковых пластинок, по большей части неподвижно соединенных между собою и расположенных меридиональными рядами, и несущими подвижно сочлененные с ним иглы, с ртом на нижней стороне тела, не окруженным щупальцами, с заднепроходным отверстием, с придатками, служащими для движения, а часто и для дыхания.

Кукумария или «морской огурец» (лат. Cusumaria), рис. 18в - это морское беспозвоночное животное. Принадлежит к семейству голотурий, отряда иглокожих. Вытянутой формы животное бурого цвета со множеством ножек вдоль брюшка. На конце кукумарии расположен рот, окруженный множеством щупалец. Питается кукумария илом. Обитает «морской огурец» в Охотском, Баренцевом и Японском морях.

Морская звезда (лат. Asteroidea), рис. 18г - класс типа иглокожих. Это звездообразные или пятиугольные иглокожие с довольно широкими и уплощенными простыми руками (лучами), которые обыкновенно постепенно переходят в более или менее пластинкообразное тело и заключают слепые выросты кишечника и отростки половых органов. Кожа снабжена правильно расположенными известковыми пластинками, которые часто снабжены иглами. Обыкновенная форма морских звезд - пятилучевая, плоская или слабовыпуклая.

Креветки, или настоящие кревётки (лат. Caridea), рис. 18д — инфраотряд ракообразных из отряда десятиногих (*Decapoda*). Широко распространены по морям всего мира, многие виды освоили пресные воды.



**Рисунок 18 Крупные донные животные**

а – гребешок; б – морской ёж; в – кукумария; г – морская звезда; д - креветки

## Рыбы

Рыбы могут быть собраны активно и пассивно в зависимости от места распространения и цели отбора проб.

В ручьях и реках глубиной до 2 м отбор проб проводят по методике электрической ловли рыбы с применением однородных полей постоянного тока и импульсных полей постоянного и переменного тока. На больших реках для отбора проб используют разнообразные механизмы.

Для медленнотекущих рек и стоячих вод предпочтительны сетевые методы. Сети для активной ловли рыбы (кошельковый невод или траловая сеть) применяют в воде, свободной от заграждений. Сети для пассивной ловли рыбы (крючки, траловые сети или рыболовные сети и другие ловушки) применяют там, где встречаются заграждения или водоросли. Специальные ловушки, встроенные в плотину, используют для мигрирующей рыбы.

Методики отбора проб рыбы выбирают в зависимости от приспособлений (размер ячейки сети, характеристики электрического поля), повадки рыб, правовых ограничений на использование электрических ловушек для ловли рыб, состояния пробы рыбы (живая или мертвая).

### Типы и методы отбора проб

Типы проб, методы отбора и их преимущественное использование приведены в таблице 1.

Таблица 1

Типы проб и методы их отбора

Тип пробы	Область применения
1 Точечные пробы	Отбор точечных проб применяют, когда поток воды не однороден, значения определяемых показателей не постоянны. Точечные пробы позволяют оценить качество воды по отношению к нормативам содержания (предельно допустимых концентрации) показателей в воде, установленных в нормативных документах (НД), а также рекомендуются для определения неустойчивых показателей (концентрация растворенных газов, остаточного хлора, растворимых сульфидов и др.).
2 Периодические пробы: - времязависящие - потокозависящие - объемозависящие	Пробы отбирают в одну или более емкостей. За фиксированное время (используя устройство отсчета времени начала и окончания отбора) в каждую емкость отбирается один и тот же установленный объем. Время отбора может зависеть от определяемого показателя. Пробы различных объемов берутся за постоянные интервалы времени, объем зависит от потока. Применяют, если изменения в составе воды и скорость потока не взаимосвязаны. Для каждой единицы объема потока воды проба берется независимо от времени. Метод отбора применяют, если изменения в составе воды и скорость потока не взаимосвязаны.
3 Непрерывные пробы: - отобранные при постоянной скорости потока	Пробы позволяют получить все сведения о показателях воды за период отбора проб, но, не обеспечивают информацией о различиях в концентрациях определяемых показателей.



Тип пробы	Область применения
- отобранные при непостоянной скорости потока	Пробы отбирают пропорционально потоку воды. Метод используют при определении состава большого объема воды. Это наиболее точный метод отбора проб проточной воды, если скорость потока и концентрация определяемых показателей изменяются значительно
4 Отбор проб сериями: - пробы глубинного профиля - пробы профиля площади	Серия проб воды, отобранных на различных глубинах исследуемой воды в конкретном месте. Серия проб воды, отобранных на определенной глубине исследуемой воды в различных местах.
5 Составная проба	Составная проба может быть получена вручную или автоматически независимо от метода отбора проб. Применяют для получения усредненных данных о составе воды.
6 Пробы большого объема	Пробы объемом от 50 дм <sup>3</sup> до нескольких кубических метров. Пробу отбирают в емкость (цистерну) пропусканием измеренного объема через фильтр в зависимости от определяемого показателя (например, ионообменный фильтр или фильтр с активированным углем используют для отбора проб некоторых пестицидов, фильтр из полипропилена со средним диаметром пор 1 мкм - для криптоспоридий). При подаче воды под давлением для контроля потока применяют регулирующий клапан. Насос располагают после фильтра и после измерителя: если пробу отбирают для определения легкотекучего показателя, то насос располагают ближе к месту отбору пробы, измеритель - после фильтра. При отборе пробы воды, содержащей взвешенные твердые частицы, которые могут загрязнять фильтр, применяют дополнительные фильтры, расположенные параллельно. При использовании более одного фильтра пробу рассматривают как составную пробу. Сточная вода, для которой режим отбора проб предусматривает возврат в основную часть исследуемой воды, из которой отбирают пробы, должна возвращаться достаточно далеко от точки отбора проб, чтобы она не могла влиять на воду, из которой отбирают пробы

#### Вопросы для самоконтроля знаний.

1. Назовите экологические зоны водоемов.
2. Что такое эвтрофное озеро?
3. Какое оборудование используют для отбора проб воды и ила?
4. В чем отличие времязависящих и объемозависящих пробоотборников?
5. Для отбора каких проб используют планктонные сети?
6. Какие бывают типы проб?

## 1.8 ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ

**Цель занятия.** Изучить способы подготовки, стерилизации и контроля посуды для отбора проб

**Оборудование и материалы:** стеклянная и пластмассовая посуда, пробки, сушевоздушный шкаф, автоклав, стерилизаторы металлические, питательные среды для контроля.

### ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ

Емкости для отбора проб должны быть тщательно промыты, чтобы свести к минимуму возможные загрязнения пробы. Тип применяемого для промывки вещества выбирают в зависимости от определяемых показателей и материала емкости.

**Подготовка посуды для отбора проб, предназначенных для определения химических показателей**

**Стеклопосуда.** Новую стеклянную посуду ополаскивают раствором моющего средства для удаления пыли и следов упаковочного материала с последующей промывкой дистиллированной или деионизованной водой. Посуду заполняют 1% раствором азотной или соляной кислоты и выдерживают не менее 1 сут или выдерживают в течение 2 ч в 15-20%-ном растворе серной кислоты (применяется только химически чистая серная кислота) или в течение 10-12 ч в 4%-ном растворе соляной кислоты. Работу необходимо проводить с соблюдением правил техники безопасности: в защитных очках, резиновом фартуке и резиновых перчатках. После обработки кислотой посуду тщательно промывают струей горячей воды (не менее 10 раз) и троекратно - дистиллированной водой, высушивают, монтируют в металлические контейнеры или в бумагу.

При определении фосфатов, кремния, бора и поверхностно-активных веществ для промывки емкостей не допускается использовать растворы моющих средств.

*Ранее использованные стеклянные емкости* моют хромовой смесью, тщательно ополаскивают водой, обрабатывают водяным паром, затем ополаскивают дистиллированной или деионизованной водой и сушат струей горячего воздуха. Допускается использовать вместо хромовой смеси концентрированную серную кислоту. Не допускается применять хромовую смесь для емкостей, используемых для отбора и хранения проб, предназначенных для определения хрома.

**Пластмассовая посуда.** Пластмассовые емкости ополаскивают ацетоном, разбавленной соляной кислотой, тщательно промывают водой, ополаскивают дистиллированной или деионизованной водой и сушат струей воздуха.

**Подготовка емкостей для отбора проб, предназначенных для определения органических веществ и паразитологического исследования.** Для отбора проб применяют только стеклянные емкости предпочтительно коричневого цвета. Емкости моют раствором моющего средства, тщательно ополаскивают дистиллированной или деионизованной водой, сушат в сушильном шкафу при 105°C в течение 2 ч и охлаждают, затем ополаскивают дистиллированной или деионизованной водой и окончательно сушат деионизованной струей очищенного воздуха или азота.

**Подготовка посуды для отбора проб, предназначенных для определения микроорганизмов.** Емкости промывают раствором нейтрального моющего средства и тщательно ополаскивают дистиллированной водой до полного удаления моющих

средств и других посторонних примесей и высушивают. Емкости закрывают силиконовыми или другими пробками, кроме ватно-марлевых, а также колпачками, изготовленными из фольги, плотной бумаги и др. В емкостях с притертой пробкой между стенкой горлышка и пробкой перед стерилизацией прокладывают полосу тонкой бумаги.

**Подготовка емкостей для отбора проб, предназначенных для определения радиоактивного загрязнения.** Емкости промывают раствором моющего средства или азотной кислотой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой.

### **СТЕРИЛИЗАЦИЯ ЕМКОВСТЕЙ**

**Стерилизация** (лат. sterilis – бесплодный, обеспложивание) - это уничтожение в каком-либо материале патогенных и непатогенных микроорганизмов в вегетативной и споровой формах.

Вся посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной. Срок хранения стерильной посуды не более 30 дней. Емкости, пробки (крышки), защитные колпачки должны выдерживать условия стерилизации. Посуда должна быть полностью укомплектована (закрыта пробками, защитными колпачками или полностью упакована (завернута в чистую плотную бумагу)). *Примечание:* материалы, используемые для упаковки емкостей, должны сохранять прочность после стерилизации.

**Стерилизация сухим жаром** - действие высокой температуры в виде сухого нагретого воздуха. Гибель клеток бактерий, грибов, дрожжей и вирусных частиц происходит в результате коагуляции белковых структур микроорганизмов.

Стерилизацию сухим жаром проводят в суховоздушном шкафу с двойными стенками облицованный снаружи теплонепроницаемым материалом. По достижении заданной температуры отмечают время начала стерилизации.

*Режим стерилизации:* при температуре 155-160°C – выдерживают 2ч; при 165-170°C – 1-1,5ч; при 180°C – 1ч. По истечении времени стерилизации нагревание прекращают, и лишь когда температура снизится примерно до 45°C шкаф открывают.

Нельзя стерилизовать жидкости, легковоспламеняющиеся вещества, питательные среды, резиновые предметы, в основном применяют для стерилизации чистой стеклянной и металлической посуды и инструментов.

**Автоклавирование** - стерилизация паром под давлением при высокой температуре в специальном аппарате – автоклаве (рисунок 19).

Вертикальный автоклав – это двустенный металлический котел цилиндрической формы, закрываемый герметично крышкой. Между стенками через специальный кран с воронкой заливают воду до определенного уровня. Внутренняя стенка котла в верхней части снабжена отверстиями, в нижней части котла – краном, через который при нагревании воды пар вытесняет воздух из котла. Автоклавирование проводит специально подготовленный специалист, так как работа по обслуживанию аппарата, работающего под давлением требует подготовки и строгого соблюдения правил техники безопасности.



**Рис. 19**  
**Автоклав ВК-30**

Автоклав загружают стерилизуемым материалом, закрывают крышку и кран, через который заливали воду, нижний кран временно оставляют открытым. Нагре-

ваемая вода между стенками автоклава кипит, образующийся пар поднимается вверх и через верхние отверстия внутренней стенки проходит внутрь котла, толчками вытесняя воздух через нижний открытый кран. Когда воздух весь вытеснен и пар начинает выходить ровной струей, нижний кран закрывают. В результате давление пара внутри автоклава повышается. Началом стерилизации считают момент, когда давление достигает заданной величины (судят по показаниям манометра). Нагрев регулируют на протяжении всей стерилизации, поддерживая давление пара на одном уровне. При чрезмерном повышении давления внутри автоклава предусмотрен предохранительный клапан, через который избыток пара автоматически выходит наружу. При повышении давления пара повышается и температура в автоклаве (табл. 2).

Таблица 2

Режимы автоклавирования

Давление	Температура	Время
0,5 атм	110-112°C;	60 мин
1 атм	120-121°C;	40 мин
1,5 атм	124-126°C;	20 мин
2 атм	133-135°C.	10 мин

Дезинфекцию лабораторной посуды с посевами микроорганизмов проводят при температуре  $132 \pm 2^\circ\text{C}$ , давление 2 атм в течение 20 мин с момента достижения указанной температуры.

Завинчивающиеся крышки не закручивают до конца, чтобы обеспечить замещение воздуха в емкости паром во время повышения температуры и предотвратить сплющивание емкостей из полимерных материалов во время их охлаждения. После стерилизации емкости плотно закрывают завинчивающимися крышками.

При таких режимах автоклавирования вегетативные формы микроорганизмов погибают в течение нескольких минут, а споры в течение 20-30 мин. Режим стерилизации выбирают в зависимости от свойств стерилизуемого материала. Манометр показывает давление пара без учета окружающего атмосферного давления (760 мм рт. ст.). По истечении времени стерилизации автоклав отключают. При нулевом показании манометра открывают кран для спуска пара. Крышку открывают осторожно на себя, не заглядывая в котел, оберегая лицо и глаза от возможного остаточного пара. До полного выхода пара открывать крышку нельзя, так как при быстром падении давления внутри автоклава стерилизуемые жидкие среды закипают и выталкиваются из пробирок пробки вместе с жидкостью.

Автоклавированием стерилизуют питательные среды, выдерживающие нагревание выше  $100^\circ\text{C}$  (МПА, МПБ), физиологический раствор, стеклянную посуду, завернутую в бумагу, перевязочный материал и спецодежду, сложенные в металлические боксы; обеззараживают использованные бактериальные культуры.

Эффективность стерилизации проверяют высевом спорного материала, который предварительно выдерживают в автоклаве вместе со стерилизуемыми объектами. После инкубирования в термостате в течение нескольких дней среды должны остаться стерильными.

**Стерилизация кипячением.** В стерилизатор наливают воду (лучше стерилизованную – дистиллированную или дважды кипяченую) так, чтобы она полностью

покрывала посуду, и добавляют 2%-й раствор гидрокарбоната натрия. Стерилизатор закрывают крышкой. После кипячения из емкостей выливают воду, немедленно закрывают их прокипяченными крышками и завертывают в чистую плотную бумагу.

Дистиллированную воду или приготовленный физраствор стерилизуют на небольшом огне в колбе.

Не допускается использовать данный метод обработки емкостей, предназначенных для отбора проб питьевой воды.

*Режим стерилизации:* температура 100°C, кипятят от 30 до 60 мин.

*Новые пробки* кипятят 30 мин в 2%-ном растворе двууглекислого натрия и пять раз промывают проточной водопроводной водой (кипячение и промывание повторяют дважды), затем кипятят 30 мин в дистиллированной воде, высушивают, заворачивают в чистую плотную бумагу или фольгу и стерилизуют в паровом стерилизаторе.

*Пробки, использованные ранее*, кипятят 30 мин в водопроводной воде с нейтральным моющим средством, промывают в водопроводной воде, высушивают, монтируют и стерилизуют.

#### **Стерилизация гамма-излучением или оксидом этилена.**

1) Емкости из полимерных материалов могут быть простерилизованы оксидом этилена. Токсичность газа требует выполнения стерилизации в специальном оборудовании при соблюдении времени, необходимого для его десорбции.

2) Эффективным способом стерилизации является выдержка емкостей в условиях воздействия гамма-излучений или ускоренных электронов в специализированных установках. При этом не обнаруживается остаточная антибактериальная активность, однако некоторые материалы подвергаются структурным изменениям вследствие их полимеризации при облучении. Б

3) Большие емкости (молочные фляги, металлические ведра и т.п.) допускается обрабатывать путем обжига их внутренней поверхности с использованием этилового спирта.

**Стерилизация этиловым спиртом.** Большие емкости (например, металлические ведра) обрабатывают путем обжига их внутренней и внешней поверхности с использованием этилового спирта.

#### **КОНТРОЛЬ СТЕРИЛЬНОСТИ ЕМКостей ДЛя ОТБОРА ПРОБ**

Приобретенные или подготовленные в лаборатории емкости должны иметь сведения о результатах контроля стерильности. Стерильность емкостей гарантируется путем контроля процесса стерилизации. Эффективность процесса стерилизации контролируют по термическим, химическим и периодически по биологическим тестам.

**Контроль стерильности** (как правило - контролируют одну емкость из ста) проводят одним из следующих методов:

**а) метод с использованием жидкого бульона.** От 20 до 50 мл питательного бульона вносят в емкость для отбора проб, ополаскивают стенки емкости бульоном, не касаясь пробки, и инкубируют при температуре 22±2°C в течение 5 сут с ежедневным просмотром. Критерием стерильности является отсутствие мутности;

**б) метод с использованием питательного агара** (метод "вращения бутылки"). 20 или 50 мл расплавленного и охлажденного до 45°C - 49°C питательного агара вносят на стенку емкости, выравнивая пленку агара путем вращения емкости во

время охлаждения. Инкубируют при температуре  $22\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 5 сут с ежедневным просмотром. Критерием стерильности является отсутствие видимого роста колоний микроорганизмов;

**в) метод высева из бульона на питательный агар.** В емкость для отбора проб вносят 20% питательного бульона от объема емкости (например, при объеме емкости 1 литр берут 200 мл питательного бульона), ополаскивают стенки емкости (включая пробку) бульоном и инкубируют при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. При отсутствии мутности проводят высева из бульона по 1 мл на две стерильные чашки Петри и заливают 12-15 мл расплавленным и охлажденным до  $45-49^\circ\text{C}$  питательным агаром. Перемешивают содержимое чашек покачиванием и после застывания агара чашки Петри с посевами инкубируют при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 48 часов. Критерием стерильности является отсутствие мутности и роста колоний микроорганизмов.

#### **Определение присутствия инактивирующего вещества**

Присутствие тиосульфата натрия (тиосульфата калия) может быть проверено йодометрическим методом: в емкость вносят 10 мл дистиллированной воды и титруют раствором йода, прибавляя к концу титрования в качестве индикатора 1 мл 1%-ного раствора крахмала. Титрование считается законченным, если от прибавления одной капли раствора йода появившаяся голубая окраска не исчезает после трех-четырёхкратного взбалтывания.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Как подготовить посуду для отбора проб, предназначенную для определения химических показателей?
2. Как подготовить посуду для отбора проб, предназначенную для определения органических веществ и паразитологического исследования?
3. Какие существуют методы и режимы стерилизации?
4. Какими методами проводят контроль стерильности емкостей для отбора проб?

### **1.9 ОТБОР ПРОБ ВОДЫ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

**Цель занятия.** Изучить способы отбора проб воды для микробиологического анализа. Ознакомиться со способами инактивации дезинфектантов, транспортировки, хранения и документирования процедуры отбора проб.

**Оборудование и материалы:** Емкости для отбора проб; дезинфицирующие салфетки для индивидуального пользования; спиртовка или газовая горелка; зажигалка, спички; пинцеты зубчато-лапчатые или корнцанги прямые; маркеры, карандаши; аккумуляторы холода; лед, пакет со льдом; переносной холодильник или холодильное отделение в средствах транспортирования; термометр или другой прибор, регистрирующий температуру; батометры для отбора проб или другие пробоотборники, приспособленные к отбору проб на различной глубине; транспортные средства и карточка идентификации личности перевозчика; водонепроницаемая обувь; стерильные перчатки.

**Реактивы:** 70% этиловый спирт, или 70% изопропанол (спирт изопропиловый), или раствор гипохлорита натрия ( $1 \text{ г/дм}^3$ ); Раствор тиосульфата натрия (18

мг/дм<sup>3</sup>); Раствор сульфида натрия (0,1 мг/см<sup>3</sup>); Раствор йода (0,05 моль/дм<sup>3</sup>); 96% этиловый спирт для фламбирования.

**Общие сведения.** Правильный отбор проб является существенным для обеспечения репрезентативных результатов лабораторных исследований качества воды по установленным микробиологическим показателям. Особенности отбора проб зависят от цели отбора и природы исследуемой воды.

Микроорганизмы являются живыми организмами. В воде они образуют не истинный раствор, а суспензию с большой степенью изменчивости.

### **Способы инактивации дезинфектантов при отборе проб воды**

При отборе проб воды, подвергнутой обеззараживанию способом окисления (например, хлором, хлорамином, бромом или озоном) инактивацию дезинфектанта проводят тиосульфатом натрия одним из способов:

- а) внесением тиосульфата натрия в емкость с пробой воды сразу после отбора;
- б) внесением тиосульфата натрия в емкость перед ее стерилизацией, при этом ёмкость должна иметь соответствующую маркировку.

Для инактивации 1 мг хлора необходимо добавить 7,1 мг тиосульфата натрия. Таким образом, в емкость вносят тиосульфат натрия из расчета: 0,1 см<sup>3</sup> раствора тиосульфата натрия на 100 см<sup>3</sup> пробы воды или 10 мг кристаллического тиосульфата натрия на 500 см<sup>3</sup> пробы воды.

Это позволяет инактивировать от 2 до 5 мг/дм<sup>3</sup> свободного остаточного хлора.

Когда используют высокие концентрации хлора требуется более высокая дозировка тиосульфата натрия.

#### *Примечания*

1) *Тиосульфат натрия не разрушается при стерилизации емкостей в автоклаве и суховоздушном шкафу.*

2) *Тиосульфат натрия не влияет на микробоценоз воды, не изменяет рН воды, имеет нейтральную реакцию и не мешает при отборе проб нехлорированных вод.*

3) *Бактерии Legionella (обитатель природных водоёмов, возбудитель острой инфекционной болезни, протекающей в виде ОРВИ) чувствительны к натрию и поэтому при отборе проб на эти микроорганизмы предпочтительно использовать тиосульфат калия.*

*При использовании других дезинфектантов применяют соответствующие методы инактивации. Для защиты от токсического воздействия тяжелых металлов, например при водоподготовке с использованием серебра или меди, могут быть использованы стерильные (путем фильтрования) растворы этилендинитрилотетрауксусной кислоты (ЭДТА) или нитрилотриацетата натрия (Na<sup>3</sup>C<sup>6</sup>H<sup>6</sup>NO<sup>6</sup>) с концентрацией около 50 мг/дм<sup>3</sup>. Серебро может быть инактивировано также раствором сульфида натрия, при этом на 1 дм<sup>3</sup> пробы воды добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора сульфида натрия.*

## **ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ПРОБ ВОДЫ**

### **Транспортирование проб**

Транспортирование проб осуществляют в чистых продезинфицированных контейнерах, обеспечивающих их сохранность. Крышка контейнера не должна соприкасаться с пробками емкостей.

Условия транспортирования должны быть документально оформлены.

При транспортировании емкости с пробами должны быть упакованы таким образом, чтобы:

- защитить их от внешнего воздействия (солнечного излучения, нагревания, загрязнения, замораживания);
- исключить непосредственный контакт проб с аккумуляторами холода, чтобы избежать замораживание пробы;
- отрегулировать количество и объем аккумуляторов холода и их расположение в зависимости от количества проб, их массы и исходной температуры пробы;
- предусмотреть раздельное размещение в контейнерах неохлажденных и охлажденных проб.

Для транспортирования предпочтительно охладить пробы до температуры 2-8°C (например, используя аккумуляторы холода), если в стандартах на определение конкретного микробиологического показателя не установлено иное.

Пробы воды для вирусологического исследования допускается замораживать и хранить при температуре минус 70 °С при добавлении к пробе соответствующего криопротектора.

#### *Примечания*

1) *В интервале температур от 0 °С до 45 °С число бактерий может меняться пропорционально температуре. Если микрофлора способна к размножению, то с увеличением температуры процесс ускоряется. Если микроорганизмы находятся в отмирающем состоянии, то этот процесс также ускоряется при нагревании. Увеличение температуры на 10 °С в два раза увеличивает скорость размножения и гибели бактерий. При транспортировании следует охлаждать пробы, но не замораживать их, так как образование льда в емкостях может приводить к гибели большинства клеток (>99%).*

2) *В оптимальных условиях одно деление бактерий E.coli происходит за 20 мин и через 10 ч количество бактерий увеличивается до  $10^9$  клеток. Однако в воде определяемые микроорганизмы находятся под влиянием биоценоза (в том числе антагонистического действия), физических и химических факторов, а также недостаточного количества питательных веществ, поэтому при данных условиях такое интенсивное размножение не может иметь место. С другой стороны, число микроорганизмов может уменьшиться вдвое менее чем за 20 мин, а при наличии в пробе дезинфектанта без инактиватора - в течение нескольких секунд.*

3) *Большинство экспериментов, выполненных в области хранения проб воды для бактериологического исследования, показывает положительный эффект охлаждения ниже 10 °С. Идеальный температурный диапазон 2-8°C достигается путем помещения емкостей с пробами воды в контейнер с аккумуляторами холода. Температура воды в емкости не сразу после помещения в контейнер достигает значения 2-8°C. Период установления температурного равновесия зависит от:*

- *контейнера (объема, эффективности изоляции);*
- *внешней (наружной) температуры;*
- *массы проб воды и их исходной температуры;*
- *типа аккумуляторов холода и их количества.*

#### **Продолжительность времени от отбора проб до анализа**

Время хранения проб воды от отбора до начала их анализа включает продолжительность транспортирования, регистрации и подготовки проб к анализу. Время



хранения должно быть минимальным, насколько возможно, и задокументировано. Анализ проб воды должен быть начат в тот же рабочий день, в который осуществлен отбор проб.

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.

*Примечания. По согласованию с заказчиком допускается увеличение максимального срока хранения проб до 8 ч.*

## **ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ**

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).

1. До отбора проб или сразу же после отбора следует нанести маркировку на емкость и заполнить акт отбора пробы.

2. Маркировка емкостей должна быть четкой, сохраняющейся в течение всего времени хранения пробы, и должна содержать следующую информацию: - место, дату и время отбора пробы.

Допускается кодирование проб с отражением номера в акте отбора проб.

3. В акте отбора проб должно быть указано:

- наименование и адрес (юридический и фактический) заказчика;
- объект исследования;
- перечень определяемых при анализе показателей или ссылку на стандарт, их определяющий;
- дата, время и место отбора проб;
- метод отбора проб со ссылкой на стандарт по отбору проб;
- условия транспортирования, включая продолжительность транспортирования, средства транспортирования - сумка-холодильник и т.д.;
- должность, фамилия, инициалы и подпись лица, проводившего отбор проб, с указанием лиц, присутствующих при отборе проб;
- цель исследования: в плановом порядке или по внеплановым мероприятиям (рекомендации органов, уполномоченных осуществлять санэпиднадзор; сигналы об изменении органолептических качеств воды, поступающие от населения и т.п.).

4. Для правильной интерпретации результатов анализа могут быть необходимы и другие сведения, например:

- температура;
- использованный дезинфектант;
- любые другие факторы и отклонения от установленных процедур, которые могут повлиять на результаты микробиологического анализа.

5. При превышении допускаемого максимального времени хранения пробы результаты испытаний должны быть внесены в протокол испытаний с указанием, что данный результат получен после <sup>ж</sup> часов хранения пробы.

## **ЦЕЛИ И ТОЧКИ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ**

### **Цели отбора проб:**

- 1) определения соответствия качества воды установленным требованиям;

2) характеристики уровня загрязнения микроорганизмами, его величины и изменчивости, при этом устанавливается:

- случайность загрязнения;
- тенденция колебания уровней загрязнения;
- наличие или отсутствие цикличности;

3) идентификации источника загрязнений.

Количество проб и частота отбора зависят от цели отбора.

### **Точки отбора проб**

Точка отбора проб должна обеспечивать представительные характеристики места отбора и учитывать любые вертикальные, горизонтальные и временные изменения.

Точки отбора проб выбирают в зависимости от цели анализа:

- в поверхностных водоемах пробы отбирают в местах водопользования (в месте водозабора, рекреации, в черте населенных пунктов и т.п.);

- при выявлении источников загрязнения:

в проточных водоемах пробы отбирают до источника загрязнения и ниже не далее 500 м по течению;

в непроточных водоемах (озерах, водохранилищах, морях) пробы отбирают в радиусе 500 м и вдоль берега;

- влияние загрязнения на зону рекреации:

в проточных водоёмах пробы отбирают на расстоянии 1 км выше по течению от зоны рекреации;

в непроточных водоёмах пробы отбирают на расстоянии от 100 м до 1 км в обе стороны на непроточных водоемах и в море, а также в границах зоны реакции;

- для контроля технологических режимов очистки и обеззараживания на станциях водоподготовки питьевой воды и обезвреживания сточных вод пробы отбирают до и после каждого этапа технологического процесса и обязательно на выходе с очистных станций. При исследованиях эффективности обеззараживания, точки отбора проб должны быть выбраны до и после полного завершения процесса обеззараживания (например, по истечении требуемого времени контакта воды с обеззараживающим средством).

Следует учитывать возможность различия результатов анализа при отборе проб в точках с нестабильными условиями, например:

- при отборе поверхностных и глубинных проб, при загрязнении проб поверхностной пленкой на воде. В некоторых случаях (например, озеро, бассейн) содержание микроорганизмов в поверхностной пленке воды может быть в 1000 раз выше, чем воды под пленкой;

- в водопроводной сети с интенсивным и низким разборами воды, в том числе тупиковых участках, застойных зонах и т.п.;

- в пробах воды, отобранных из хорошо перемешанной массы воды в резервуаре и на входе в резервуар.

При выборе точки отбора проб следует учитывать влияние физических (температуры, скорости течения и др.) и химических факторов (рН, наличие токсичных для веществ и др.), которые могут отрицательно влиять на выживаемость и стабильность физиологического состояния исследуемых организмов.

## **ТРЕБОВАНИЯ К ОТБОРУ ПРОБ.**

При отборе проб воды в одной и той же точке для различных целей первыми отбирают пробы для микробиологического анализа.

Не допускается:

- пробу воды, предназначенную для микробиологического анализа, использовать для измерения температуры или другого показателя;
- ополаскивать емкости для отбора проб перед отбором проб.

При отборе проб должны быть обеспечены асептические условия (чистые руки или стерильные перчатки) и защита проб от пыли и попадания брызг.

Для отбора проб применяют чистые стерильные емкости, изготовленные из стекла или полимерных материалов (например, полипропилена, полистирола, полиэтилена, поликарбоната), не оказывающих влияние на жизнедеятельность микроорганизмов. Для многократного применения предпочтительны емкости из стекла; емкости из полимерных материалов используют как одноразовые.

Для отбора проб погружением в чистую воду используют емкости, которые должны быть стерильными как внутри, так и снаружи, и защищены от загрязнений при хранении после стерилизации, например упаковыванием в плотную бумагу, алюминиевую фольгу или пакеты из полимерных материалов, пригодных для стерилизации.

*Примечание: упаковку открывают перед началом отбора пробы. После отбора пробы ее можно использовать в качестве средства защиты при транспортировании пробы.*

При использовании емкости, не защищенной снаружи от загрязнений, непосредственно перед погружением в воду необходимо обработать ее внешнюю поверхность дезинфектантом, например этиловым спиртом, и сразу же высушить. Этот способ не подходит при анализе спорообразующих бактерий.

Емкости для отбора проб должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или пластмассовыми), закрывающимися нажатием крышками или завинчивающимися металлическими или пластмассовыми крышками. Пробки и крышки должны выдерживать условия стерилизации.

Горловины емкостей для многократного использования должны быть защищены от внешнего загрязнения колпачками из алюминиевой фольги или плотной бумаги, не разрушающимися после стерилизации сухим жаром или автоклавированием.

### *Примечания*

*1) Металлические крышки, особенно из алюминия, после стерилизации в автоклаве могут стать токсичными по отношению к микроорганизмам. Это влияние устраняют путем использования термо- и водостойких прокладок.*

*2) Некоторые виды материалов из хлопка, используемых в качестве пробок для стеклянной посуды, при длительном воздействии высоких температур при стерилизации могут стать токсичными, что при возможном контакте с водой при транспортировании может повлиять на результаты анализа. В связи с этим не допускается применять ватные пробки.*

*3) Надевающиеся нажатием пластмассовые крышки, прикрепленные к емкости, имеют несколько преимуществ: обладают такой же надежностью от протечек, как*

*и закручивающиеся крышки; остаются стерильными при заполнении емкости, будучи связанными с емкостью и тем самым защищенными от загрязнения.*

Простерилизованные емкости должны иметь маркировку с указанием даты стерилизации для последующего учета установленного срока хранения.

При отборе проб воды, подвергнутой обеззараживанию с помощью дезинфектанта, необходимо проводить его инактивацию.

Если инактивация дезинфектанта невозможна или невыполнима для конкретных условий, то информацию об этом заносят в акт отбора проб.

Емкость, в случае внесения инактивирующего вещества (тиосульфата натрия) до ее стерилизации, должна иметь соответствующую маркировку.

Вместимость емкости для отбора проб должна соответствовать объему воды, необходимому для определения микробиологических показателей. Вместимость емкости для отбора проб должна быть не менее 500 см<sup>3</sup>, что достаточно для определения 4-5 индикаторных микроорганизмов. В некоторых случаях необходимо использовать больший объем пробы, например для анализа питьевой воды, расфасованной в емкости.

Если для анализа необходимы очень большие объемы, например, при определении вирусов, цист амёб и *Giardia*, ооцист *Cryptosporidium*, анализируют десятки и сотни литров воды.

Стерильную емкость для отбора проб открывают непосредственно перед отбором пробы, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Пробка и края емкости не должны касаться посторонних поверхностей.

После наполнения емкость немедленно закрывают стерильной пробкой, обеспечивая герметичность и не намокающей при транспортировании, и стерильным колпачком. При заполнении емкости должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью налитой воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании и для обеспечения перемешивания пробы перед анализом.

Отбор проб проводят продезинфицированными (обработаны этиловым спиртом или дезинфицирующими салфетками для индивидуального пользования) непосредственно перед отбором руками или в стерильных перчатках.

### **ОТБОР ПРОБ ВОДЫ**

Устройства, применяемые для отбора проб, должны быть стерильными или простерилизованы после каждого отбора.

**ОТБОР ПРОБ ВОДЫ ИЗ СКВАЖИН, РОДНИКОВ И КОЛОДЦЕВ** проводят с целью определения:

- а) качества воды в водоносном горизонте;
- б) качества воды в водопункте (скважине, колодце);
- в) качества потребляемой воды.

**Отбор проб воды из скважин и колодцев с использованием стационарно установленного насоса**

Система подачи воды из скважин и колодцев, в которых стационарно установлен насос, должна иметь металлический кран или выходное отверстие.

Для определения качества воды в водоносном горизонте: насос должен работать до тех пор, пока не установится постоянное значение температуры спускаемой воды, после чего проводят отбор проб.

Для определения качества воды в водопункте (скважине, колодце): требуется минимальное время работы насоса только для обеспечения потока воды, необходимого для смывания дезинфектанта, которым был обработан кран, после чего проводят отбор проб воды.

Для определения качества потребляемой воды отбор проб проводят без предварительного спуска воды (при производственном режиме работы насоса) и дезинфекции крана.

### **Отбор проб воды из скважин и колодцев с применением временно установленного насоса**

Отбор проб из скважин и колодцев, не имеющих стационарно установленного насоса, проводят:

- для определения качества воды в водоносном горизонте с использованием временно установленного насоса после продолжительной откачки воды;

- для определения качества воды в водопункте с использованием стерильного батометра с прикрепленным грузом. Допускается использовать временно установленный насос, при этом отбор проб проводят после предварительного минимального спуска воды перед отбором проб;

- для определения качества потребляемой воды с использованием ведра, бидона или ковша и т.п., которые заполняют водой, после чего воду переливают в стерильные емкости. При этом отбор проб воды проводят с применением стационарного или временно установленного водоподъемного оборудования (ворота, "журавля" и т.п.).

**Отбор проб воды из бездействующих (неиспользуемых) скважин и колодцев** проводят с применением временно установленного насоса или водоподъемного оборудования (ведро, бидон, ковш и др.). Пробы отбирают в самом начале откачки для определения качества воды и в конце откачки.

**Отбор проб воды из фонтанирующих скважин** проводят из устья скважины.

**Отбор проб воды из родников** проводят в месте выхода родника ("грифона") на поверхность земли.

Проба воды из фонтанирующей скважины и родника характеризует качество подземных вод в водоносном горизонте.

### **ОТБОР ПРОБ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД**

*Поверхностные пробы* отбирают с глубины 10-30 см от поверхности воды или от нижней кромки льда.

*Придонные пробы* отбирают с глубины 30-50 см от дна.

Отбор проб проводят с использованием плавучих средств, мостов, помостов и других приспособлений в местах, где глубина водоема не менее 1,0-1,5 м. Не допускается проводить отбор проб с берега.

Пробы воды рекомендуется отбирать батометром:

- поверхностные пробы отбирают батометром, состоящим из штанги длиной около 1 м, к которой прикрепляется площадка для установки стерильной емкости для отбора проб и подвижное устройство для крепежа емкостей разных размеров;

- глубинные пробы отбирают батометром, состоящим из платформы с грузом, к которой прикрепляется стерильная емкость для отбора проб с пробкой (при этом пробка открывается с помощью прикрепленной к ней веревки при достижении нужной глубины).

Допускается использование других систем, например специального устройства, состоящего из стеклянной емкости под вакуумом, которая оснащена резиновой пробкой и стеклянной трубкой, запаянной и закрепленной недалеко от троса. Когда емкость для отбора проб находится на необходимой глубине, по тросу посылается груз, он разбивает трубку, и емкость заполняется водой.

Для изучения барофильных бактерий используют шприцевые системы и другие устройства, наиболее сложные из которых поддерживают в пробе воды давление.

Когда используют устройства для отбора проб или плавучие средства применяют багор (*инструмент, состоящий из деревянной или металлической рукояти длиной более метра, с наконечником в виде шипа, соединённого с загнутым назад крюком*), следует сводить к минимуму взмучивание донных отложений.

Любые возможные загрязнения стерильных устройств для отбора проб за счет средств крепления (веревки, каната, троса) должны быть сведены к минимуму, например использованием проволоки из нержавеющей стали или цепочки на нижнем конце троса.

### **ОТБОР ПРОБ РЕКРЕАЦИОННЫХ ВОД**

Воды для купания оценивают после серии анализов воды в течение купального сезона.

Следует строго определить точки отбора. Точки отбора проб должны быть представительными для характеристики качества воды в местах, используемых большинством купальщиков, или в местах предполагаемого загрязнения в зависимости от цели отбора проб.

Пробы отбирают в соответствии с требованиями, предъявляемыми к отбору проб.

При отсутствии специального батометра чистую стерильную емкость для отбора проб вводят вверх дном в воду на заданную глубину и заполняют емкость водой, поворачивая ее в разные стороны. При наличии потока воды емкость следует держать против течения (вверх по течению).

Если в местах купания глубина воды менее 1 м, то допускается отбирать пробы на меньшей глубине, о чем указывают в актах отбора проб. Следует принять меры к минимизации взмучивания донных отложений.

#### *Примечания*

1) *Одна из главных причин изменения качества воды на пляже - ресуспендирование (смешивание) бактерий, адсорбирующихся на глине, иле или органических осадках.*

2) *Следует обратить внимание на различные естественные и технические источники ресуспендирования, которые могут увеличивать санитарные риски, например весенние паводки, шторм, судоходство.*

3) *Неправильно проведенный отбор проб может также привести к ресуспендированию бактерий, например, заполнение емкостей водой слишком близко ко дну, взмучивание осадков, движение, создаваемое судном, с которого проводят отбор проб.*

### **ОТБОР ПРОБ ВОДЫ МОРЕЙ, ОЗЕР И РЕК**

Отбор проб для оценки качества природной морской, озерной и речной воды проводят с целью:

- выбора места расположения глубоководных и прибрежных выпусков сточных вод;
- выбора места расположения водозаборов для централизованного питьевого водоснабжения;
- водозаборов для плавательных бассейнов;
- в черте населенных мест;
- определения мест рекреационного водопользования;
- опреснения природной морской воды и других целей.

При выборе точек отбора проб необходимо учитывать характер прибрежных течений, вертикальную стратификацию (расслоение), переформирование дна, силу господствующих ветров, приливы и отливы и другие природные особенности, в том числе сезонные.

Допускается использовать любые устройства для отбора поверхностных и глубинных проб, за исключением емкостей, которые не пригодны для стерилизации.

При движении плавучих средств (корабля, лодки, судна и т.п.) пробы воды следует отбирать с подветренного борта; со стоящего на якоре плавучего средства - с носа.

### **ОТБОР ПРОБ СТОЧНЫХ ВОД**

С целью минимизации риска инфицирования персонала при отборе проб следует использовать одноразовые перчатки или стерильные приспособления для удерживания стерильной емкости при отборе проб.

После отбора проб удаляют загрязнения с внешней поверхности емкости и упаковывают емкость в чистый пакет или заворачивают в чистую плотную бумагу.

Транспортируют емкости в промаркированных контейнерах отдельно от емкостей с пробами питьевой воды. Для отбора проб пригодны любые устройства.

### **ОТБОР ПРОБ ВОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АССОЦИИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Образцы биопленки отбирают путем механического соскабливания с поверхности стерильным шпателем, лопаткой, лезвием или тампоном. Образец биопленки помещают в стерильную емкость и анализируют после гомогенизации.

*Примечание: процедура механического соскабливания разрушает пространственное соотношение микроорганизмов.*

Коррозионно-активные бактерии определяют в осадках, полученных после фильтрования или центрифугирования. Продукты коррозии металла отбирают соскабливанием или действием "водного молотка" (резкое изменение давления в водной трубе).

Сульфатредуцирующие бактерии иногда обнаруживаются в воде, но их роль в коррозии металла более надежно доказывается взятием мазка из влажных каверн (полость) на поверхности металлических конструкций, находящихся в воде.

### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Какими способами инактивируют дезинфектанты?
2. Каковы условия транспортировки проб воды?
3. Что указывают в акте отбора проб воды?
4. С какой целью проводят отбор проб воды?
5. Что указывают в акте отбора проб воды?
6. С какой целью проводят отбор проб воды?
7. Какие точки отбора проб воды Вы знаете?

## 1.10 МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ

**Цель занятия.** Изучить микроскопические методы исследования.

**Оборудование и материалы:** микроскоп, пробы ила и воды, фазово-контрастное устройство, микрометр окулярный, предметный стекла, парафин расплавленный горячий, МПА расплавленный горячий, покровные стекла, скальпель, плоские капилляры.

### Метод фазовых контрастов для исследования живых объектов

Этот метод позволяет получать контрастное изображение при наблюдении под микроскопом неокрашенных неконтрастных объектов. При этом темные и светлые места изображения соответствуют различной толщине или оптической плотности объектов в препарате.

Основная часть контрастного устройства — специальные фазовые ахроматические объективы, имеющие на одной из внутренних поверхностей линзы фазовое кольцо определенных размеров и револьверный диск с кольцевыми диафрагмами, которые устанавливаются перед конденсором. Фазовые объективы используют с обычными окулярами Гюйгенса. При выключении кольцевых диафрагм фазовые объективы могут употребляться как обычные, однако качество изображения получается хуже вследствие наличия в них фазового кольца.

При работе с фазово-контрастными устройствами соблюдают следующий порядок работы:

- 1) выбранные окуляр и фазово-контрастные объективы вставляют в тубус микроскопа;
- 2) нормальный конденсор микроскопа вынимают и в освободившееся гнездо вставляют фазово-контрастный конденсор, револьвер которого ставится на "О";
- 3) микроскопический препарат помещают на столик микроскопа и фокусируют;
- 4) устанавливают освещение;
- 5) полностью открывают ирисовую диафрагму конденсора;
- 6) вынимают из тубуса окуляр Гюйгенса и вместо него вставляют вспомогательный микроскоп (рис. 20), прилагаемый к фазово-контрастному устройству, окуляр вспомогательного микроскопа перемещают так, чтобы было резко видно фазовое кольцо объектива, при этом нельзя трогать ни грубую, ни тонкую подачу тубуса микроскопа;

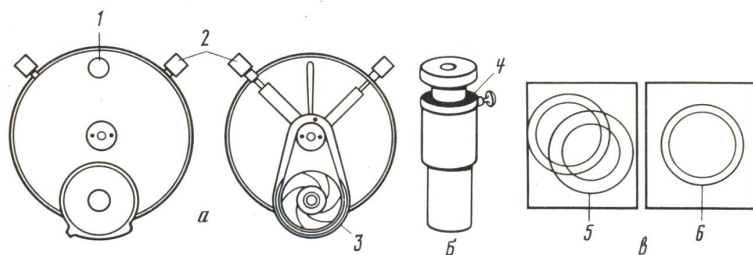


Рис. 20 Фазово-контрастное устройство

**а – фазово-контрастный конденсор:** 1 – окно кожуха конденсора, 2 – центрировочные винты конденсора, 3 – ирисовая диафрагма конденсора; **б – вспомогательный микроскоп:** 4 – окуляр вспомогательного микроскопа; **в** – фазовое кольцо объектива и светлое кольцо диафрагмы вспомогательного микроскопа: 5 – неправильное совмещение светлого и темного колец, 6 – правильное совмещение светлого и темного колец.



7) вращением револьвера конденсора включают диафрагму, соответствующую включенному объективу, при этом в окне кожуха конденсора должна появиться цифра, соответствующая увеличению объектива;

8) вращая центрировочные винты конденсора, совмещают видимое во вспомогательный микроскоп светлое кольцо с темным кольцом;

9) снова заменяют вспомогательный микроскоп окуляром Гюйгенса.

Для получения большего эффекта рекомендуется пользоваться светофильтрами, входящими в комплект фазового контраста.

При смене объектива или препарата следует проверять центровку кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива.

Возможные неполадки:

1) поле зрения освещено неравномерно, появляются темные пятна, что зависит от неправильной установки освещения по Келлеру;

2) после включения кольцевой диафрагмы поле зрения становится темным; это зависит от того, что закрыта ирисовая диафрагма;

3) если получается недостаточный контраст, то необходимо проверить центровку фазово-контрастного устройства с помощью вспомогательного микроскопа.

### **Микроскопия в отраженном свете**

Специфика метода заключается в том, что освещение исследуемого объекта осуществляется сверху через специальный эпиобъектив. Метод рекомендуется для обнаружения и количественного учета некоторых специфических групп микроорганизмов в природных водах. Для этого через мембранные фильтры\* профильтровывают исследуемую воду. Фильтры высушивают и разрезают на две равные части. Одну половину окрашивают эритрозином, а другая остается неокрашенной. Обе половины фильтра пропитывают иммерсионным маслом (при этом фильтры просветляются) и сверху покрывают покровным стеклом.

В окрашенной половине подсчитывают общее число бактерий.

Неокрашенную половину смотрят только в отраженном свете с помощью эпиобъектива.

Метод дает возможность хорошо отличать окрашенные фотосинтезирующие серобактерии от бесцветных форм.

*В темнопольном отраженном свете* виды фототрофных бактерий, имеющие зеленую окраску, светятся голубым светом и легко могут быть определены и подсчитаны. К таковым относятся *Chlorobium*, *Pelodictyon*, *Prosthecochloris*, консорциум *Pelochromatium* и др. Виды, имеющие коричневую окраску, светятся желто-зеленым светом — *Chlorobium phaeobacteroides*, *Pelochromatium roseum*.

Серные пурпурные бактерии в темном поле имеют розовую окраску.

*В светлопольном отраженном свете* в клетках отчетливо видны газовые вакуоли как ярко блестящие включения, а также хорошо видны включения серы. Кроме фотосинтезирующих бактерий, в отраженном свете хорошо видны и другие микроорганизмы, обладающие газовыми вакуолями.

Серные пурпурные бактерии не выявляются в светлом поле.

\*Мембранный фильтр состоит из нескольких полупроницаемых слоев нитрат целлюлозы, которые соединены вместе. Этот материал обеспечивает оптимальные условия роста задержанных микроорганизмов. Мембранная фильтрация незаменима для избавления воды от микробов. Принцип метода мембранной фильтрации – кон-

центрирование присутствующих в анализируемой пробе микроорганизмов на поверхности мембранного фильтра с размером пор 0,45-0,65 мкм путем пропускания пробы через фильтр.

### Изготовление окулярного сетчатого микрометра

При учете общего числа бактерий производят подсчет количества бактерий на определенной площади препарата. Для этого необходимо иметь окулярный сетчатый микрометр, который помещают на диафрагму окуляра микроскопа. Диафрагму следует поставить так, чтобы при ввинченной верхней линзе деления сетчатого микрометра были четко видны.

Окулярный сетчатый микрометр можно изготовить самостоятельно, нанося алмазным или корундовым карандашом тонкие линии на стеклянные пластинки.

1. Стеклянные пластинки (14×14 мм) нарезают из предметных стекол.

2. При нанесении тончайших линий на стекло можно взять корундовую иглу (*корунд - минерал*), которая используется для проигрывания долгоиграющих пластинок. Иглу в держателе рекомендуется вставить в тонкую металлическую трубочку и закрепить.

3. Нанесение тончайших штрихов на стеклянные пластинки производят на оптической доске (рис. 21). На одном конце доски (длиной 60 см, шириной 10 см) параллельно ее длине закрепляют металлическую измерительную линейку с делениями, на другом остром вверх вбивают небольшой гвоздь или иглу, на которой вращается фанерная дощечка с наклеенной на нее миллиметровой бумагой. Ось проходит через центр дощечки.

4. Для нанесения делений на стеклянную пластинку используют пластмассовый или деревянный стержень длиной около 55 см, в который с одной стороны вставляют стальную иглу, а с другой (в отверстие в стержне) — корундовую. Между стальной и корундовой иглами расстояние должно быть порядка 50 см.

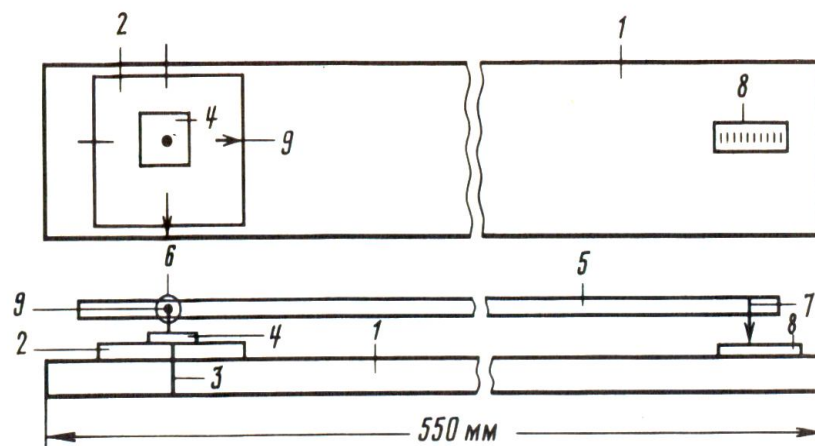


Рис. 21 Установка для изготовления окулярного сетчатого микрометра

1 – доска, на которой монтируется установка; 2 – вращающаяся на оси дощечка; 3 – ось вращения (гвоздь); 4 – стеклянная пластинка, на которую наносятся деления; 5 – металлический рычаг; 6 – корундовая игла; 7 – стальная игла; 8 – металлическая миллиметровая линейка с делениями; 9 – шуруп для крепления корундовой иглы.

Нанесение делений на стеклянную пластинку производят следующим образом. На центр вращающейся фанерной дощечки кусочком разогретого воска прикрепляют стеклянную пластинку, на которую хотят нанести деления. Затем стальную иглу рычага точно ставят на деление линейки, так, чтобы корундовая игла была на 2,5 мм дальше центра стеклянной пластинки, и наносят штрих на ее поверхность.

Далее передвигают стальную иглу на 1 мм и вновь корундовой иглой делают второй штрих на стекле, который отстоит от первого точно на 1 мм. Эту процедуру повторяют 6 раз. Далее фанерную дощечку, не снимая с оси, поворачивают на 90° и всю операцию повторяют заново. При этом в центре стеклянной пластинки будет начерчена сетка в 25 мм<sup>2</sup>, которая и может служить окулярным сетчатым микрометром.

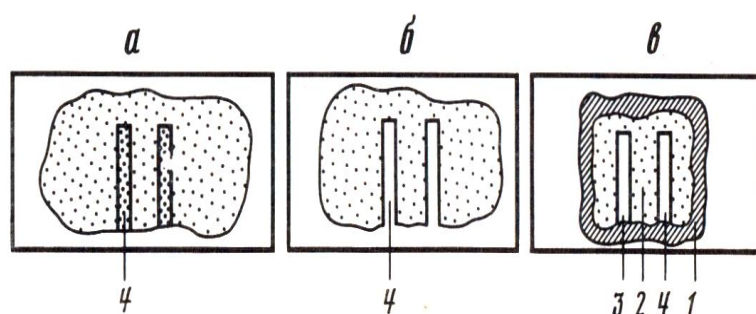
Необходимо заметить, что нужно предварительно научиться наносить четкие линии на стекло. При неправильном повороте корундовой иглы или слишком сильном нажиме стекло по краю линии начинает крошиться и сеточка получается негодной для использования в качестве окулярного микрометра.

При легком нагревании сеточку снимают с фанерной дощечки, края ее подшлифовывают на корундовом бруске и после промывки спиртом помещают в окуляр микроскопа.

### Ш-образная камера Пешкова

Этот тип камеры для прижизненного наблюдения над микроорганизмами позволяет применять оптические системы, имеющие рабочую численную апертуру (отверстие) выше 1. Изготовление камеры производится следующим образом. Предметное стекло не толще 0,5 мм фламбируют и устанавливают по уровню строго горизонтально. На поверхность стекла наливают слой стерильного расплавленного прозрачного агара толщиной не более 0,2 мм (рис. 22а). Среде дают застыть, стерильным скальпелем делают шесть разрезов в виде буквы Ш. Затем из получившихся канавок выталкивают ненужные полоски агара (рис. 22б). В результате получается Ш-образный слой питательной среды. Засевают испытуемой культурой лишь среднюю полосу, граничащую справа и слева с воздушными канавками.

Посев производят, нанося каплю бактериальной суспензии стерильным стеклянным капилляром на среднюю полосу. Засеянную камеру покрывают стерильным тонким покровным стеклом так, чтобы оно плотно прилегало к слою агара. Слой агара, выступающий за пределы покровного стекла, обрезают, и покровное стекло по краям герметически закупоривают расплавленным парафином (рис. 22в).



**Рис. 22 Ш-образная камера Пешкова** а-в – последовательность операций; 1 – слой парафина, закрепляющий покровное стекло на поверхности агара; 2 – место засева агаризованной питательной среды; 3 – воздушные канавки; 4 – надрезы в слое питательного агара.

Наличие двух канавок с воздухом гарантирует нормальное развитие аэробных бактерий, герметичность камеры предохраняет препарат от подсыхания, а применение агаризованных сред исключает броуновское движение бактерий и создает оптимальные условия для фотосъемки.

## Изучение микрофлоры поверхностного слоя ила в микробном пейзаже

В поверхностном слое ила находится большое разнообразие микроорганизмов (Б.В. Перфильев, Д.Р. Габе, 1961).

Наиболее четкую картину микробных пейзажей указанные авторы получили в образованиях стеклянных поверхностей. У иловых микроорганизмов, погребенных при перемешивании ила и оказавшихся в неблагоприятных условиях, образуются подвижные клетки, перемещающиеся в горизонты ила с оптимальным физико-химическим режимом. Там эти клетки прикрепляются и начинают размножаться, образуя характерный тип данного ила и микробный пейзаж. Чтобы эти картины перенести под микроскоп без нарушения, авторы использовали прибор, названный ими капиллярным пелоскопом. Пелоскоп — стеклянное капиллярное устройство для изучения иловых микробных обрастаний.

Основу прибора (рис. 23) составляет набор из 4—5 капиллярных ячеек (а) длиной 1—2 см. В каждой капиллярной ячейке 5 капилляров прямоугольного сечения с просветом  $40 \times 200$  мкм. Капилляры прикрепляются тонким резиновым кольцом к стеклянной палочке и помещаются в стакан, куда был помещен перемешанный поверхностный ил из водоема.

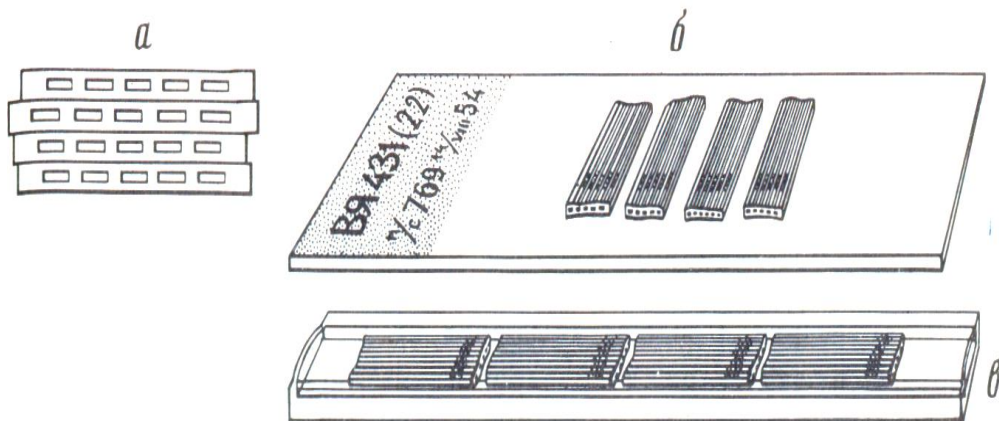


Рис. 23 Использование плоскопараллельных капилляров Перфильева для изучения микрофлоры в водной толще и в донных отложениях: а — блок капилляров прямоугольного сечения; б — крепление на предметном стекле; в — крепление в стеклянном пенале.

Иловый раствор проникает в капилляры, и по микрозонам распределяются микроорганизмы. После извлечения капилляров из ила характер и распределение микроорганизмов можно хорошо контролировать под микроскопом.

Изучение микробного пейзажа ила складывается из следующих операций:

1. Образец ила из придонной воды отбирают в стеклянный стакан и тщательно перемешивают. После отстаивания ил должен занимать примерно  $3/4$  общего объема.

2. Пачку из 4—5 капиллярных ячеек прикрепляют кольцом из резины к стеклянной палочке или к специальному держателю с вмонтированной в него лентой из миллиметровой бумаги.

3. Капиллярные ячейки погружаются вертикально в ил с таким расчетом, чтобы они пересекли горизонт. При введении пелоскопов в ил нельзя оставлять в капиллярных ячейках воздух, так как он препятствует засасыванию илового раствора. Поэтому пелоскоп следует опускать в сосуд с илом постепенно. В один сосуд одновременно помещают несколько пелоскопов.

4. Сроки пребывания пелоскопических капилляров в иле, зависят от скорости и быстроты развития микроорганизмов. Пределы колебания от 2—3 дней до нескольких месяцев. Срок экспозиции капилляров устанавливается опытным путем.

5. Пелоскоп, вынутый из ила, осторожно обмывают снаружи водой, пачку ячеек снимают с держателя и извлекают из кольца. Каждую капиллярную ячейку обтирают снаружи чистой тряпочкой, укладывают на предметное стекло верхним концом в одну сторону и немедленно микроскопируют, предохраняя от высыхания.

6. При изготовлении фиксированных препаратов пелоскопические капилляры опускают в слабый раствор формалина.

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. С какой целью применяют микроскопию в отраженном свете?
2. Как готовят Ш-образную камеру Пешкова ?
3. Как изучают микробный пейзаж ила?

## 1.11 ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Цель занятия.** Изучить методы электронной микроскопии, способы изготовления препаратов из проб воды и грунта.

**Оборудование и материалы:** Электронный микроскоп, исследуемые пробы воды и грунта, подложки, чашки Петри, предметные и покровные стекла, дистиллированная вода, пипетки, фильтровальная бумага, мембранные фильтры, бактериальные суспензии из концентрата бактерий природных вод.

**Реактивы:** 1% р. коллодия, 2,5% р. формалина или глутаральдегида, формалин, 10, 25, 50, 75 или 100% р-ры этанола, фреон, р. гидроксида натрия (NaOH).

**Общие сведения.** Методы световой микроскопии основаны на использовании видимой части спектра с длиной волны около 550 нм., поэтому максимальная разрешающая способность, которая может быть получена при помощи светового микроскопа, не превышает 0,1 мкм., следовательно, все объекты менее 0,1 мкм в световом микроскопе невидимы.

Электронная микроскопия основана на применении пучка электронных лучей с длиной волны около 0,005 мкм. Применение электронной техники к изучению микрофлоры водоёмов сразу показало наличие целого мира микроорганизмов, плохо различимых в световом микроскопе.

Для исследования биологических объектов под электронным микроскопом обычно используются увеличения в 10000 - 50000 раз.

**Изготовление препаратов из проб воды.** Объект для исследования наносится на подложку, которая должна быть прозрачной для пучка электронных лучей. Такие подложки обычно изготавливаются из коллодия толщиной 10—15 мкм и помещаются на медные или никелевые сеточки диаметром около 3 мм. Последние предварительно очищают кипячением в 10%-м растворе аммиака и отмывают водой. С целью увеличения сорбционных свойств коллодиевой пленки и лучшего прикрепления бактерий непосредственно перед нанесением исследуемого материала сетки с пленкой подвергают ионизации в специальной вакуумной установке. Благодаря этой

процедуре пленка приобретает положительный заряд, что способствует сорбции клеток, имеющих, как правило, отрицательный поверхностный заряд.

### ***Методы нанесения материала на сетки.***

1. Если хотят исследовать микрофлору воды в целом, то медные сеточки кладут на дно чашки Петри и заливают дистиллированной водой. На поверхность воды наносят 1 каплю 1%-го раствора коллодия (предварительно высушенного в вакуумной установке) в амилацетате (растворитель). Капля растекается, и на поверхности воды образуется тончайшая пленка коллодия. Первую пленку удаляют с целью очистки поверхностного слоя воды от бактерий, и на поверхность воды наносят вторую каплю коллодия. На эту пленку точно над сетками наносят капельки бактериальной суспензии из концентрата бактерий из природной воды, полученной путем фильтрации не до конца через мелкопористый мембранный фильтр. При этом происходит диализ (удаление) солей из капли через пленку, который длится от 14 до 17 ч. По окончании диализа воду из чашки Петри отсасывают пипеткой. Подложка из коллодия оседает на дно чашки, а капли на подложке попадают как раз на медные сеточки. После подсыхания капель сеточки вместе с осевшей на них подложкой осторожно вынимают из чашки Петри и подсушивают.

2. Предварительно очищенные сетки помещают на предметном стекле на дно чашки Петри, заливают водой, на поверхность наносят каплю коллодия. Через 10 мин воду отсасывают, и коллодиевая пленка оседает на сеточки. Последние с чистой подготовленной подложкой высушиваются. После этого из диализированных капель испытуемой воды или суспензии бактерий берут небольшие капли и наносят пастеровской пипеткой на подложки с коллодиевой пленкой.

3. При изготовлении бактериальных препаратов для электронного микроскопа из воды естественных водоемов методом адсорбции на сетке используют свойство бактерий адсорбироваться на различных твердых субстратах. Для этого металлические сетки, покрытые пленкой, помещают на 1 ч в воду, взятую в чистую посуду из водоема. Время выдерживания сеточек в воде для прикрепления бактерий можно варьировать. По прошествии этого времени сеточки споласкивают дистиллированной водой, фиксируют в 2,5%-м растворе формалина или глутаральдегида (дезинфицирующие вещества), вновь споласкивают и высушивают.

***Фиксация препаратов.*** Для фиксации бактерий в процессе диализа на внутреннюю часть крышки Петри накладывают полоску фильтровальной бумаги, смоченную формалином. Однако предпочтительнее проводить фиксацию клеток глутаральдегидом.

Осевшие на пленку бактерии фиксируют путем погружения сеточек в 2,5%-й раствор глутаральдегида в 0,05М фосфатном буфере при pH 7,0 - 7,2 на 1ч при 4°. Для лучшей сохранности поверхностных структур, внеклеточных полимеров и морфологии клеток рекомендуется после фиксации и подсушивания на воздухе провести обезвоживание материала путем последовательных 10-ти минутных погружений сеток сначала в серии этанола возрастающей концентрации (10, 25, 50, 75, 100%), а затем путем высушивания при критической точке в фреоне. Для этого сеточки после обработки спиртом подсушивают и помещают в смесь фреона 113 и этанола в соотношении 1:1, затем в 100%-й фреон 113 по 15 мин. Высушивание при критической точке осуществляется с использованием фреона 13. После этого образцы напыляют

в вакуумном испарителе золотом и просматривают в трансмиссионном микроскопе при ускоряющем напряжении 60—80 кВ.

Для изучения естественной микрофлоры используется метод обрастания бактериями предметов, погруженных в водоем. С этой целью 4—5 предварительно очищенных медных или никелевых сеточек помещают в ряд на формваровую или коллодиевую пленку на поверхности дистиллированной воды в чашке Петри. Затем формваровую пленку вместе с сеточками опрокидывают на чистое предметное стекло так, чтобы сеточки находились под пленкой. Края высушенной пленки прикрепляют к стеклу кусочками пластыря, и всю установку помещают в водоем на срок от 1 до 24 сут или в сосуд с испытуемой водой.

При извлечении стекол нужно обращать внимание, чтобы на них не попал сес-тон с поверхностной пленки воды из водоема. Не касаясь формваровой пленки на сеточках, стекла высушивают в вертикальном положении и фиксируют. Перед просмотром под электронным микроскопом препараты подвергаются напылению под углом 11 - 18°. Поверхность предметного стекла с одной стороны делают матовой. С этой целью на стекло наносят наждачный порошок и увлажняют его. Слегка прижимающей рукой порошок, производят круговые движения, пока поверхность стекла не станет матовой. При этом пленка, удерживающая сеточки, прочно пристает к матовой поверхности стекла.

**Контрастирование препаратов.** При незначительной толщине бактериальных объектов они могут быть слишком прозрачны для пучка электронов. Поэтому существует ряд методов осаждения тончайшего слоя металла на поверхности бактериального организма, которые позволяют сделать его более контрастным для пучка электронов. Остановимся на двух принципиально разных методах оттенения препарата.

1. *Метод напыления* заключается в том, что препараты помещают в вакуумный испаритель. В испарителе имеется вольфрамовая спиральная нить, которая нагревается до 1500°. Внутрь спирали помещают испаряемый металл в виде порошка или гранул - хром, платина, золото и т.п. Нить нагревается электрическим током, и при соответствующей температуре металл испаряется, атомы его разлетаются прямолинейно во все стороны. Если на их пути поместить на несколько секунд объект под углом 15 - 20°, то на его поверхности осядет слой металла разной толщины.

На поверхность объекта, расположенного перпендикулярно к направлению полета частиц, осаждается наиболее толстый слой металла. В тех местах, где объект экранирует полет пучка частиц металла, образуются тени. Вследствие того что разные части объекта по разному воспринимают пары металла, толщина его осаждения различна, а это, в свою очередь, повышает контрастность изображения.

2. *Контрастирование препарата солями тяжелых металлов.* Имеются негативный и позитивный способы контрастирования препаратов с помощью фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК).

*Негативный способ* состоит в том, что на сеточку с подсохшей каплей воды наносят каплю 1%-го раствора ФВК при рН 7,2. Спустя 1 – 5 сек каплю красителя удаляют фильтровальной бумажкой и сетку подсушивают. При таком способе контрастирования соли ФВК оседают на пленку, а выступающие на ней объекты остаются светлыми. Этим способом особенно удобно оттенять поверхностные структуры микроорганизмов.

*Позитивный способ* контрастирования заключается в том, что при кислом рН, равном 3,4 или 1,7 соли ФВК химически связываются с белковыми структурами клетки, повышая их контрастность, фон остается белым. Для этого каплю 1%-го раствора ФВК при рН 1,7 наносят на 2 - 4 сек. на сетку с препаратом и затем быстро подсушивают, помещая ее пленкой вниз на фильтровальную бумагу. Фон остается в этом случае светлым, контрастными выглядят белковые структуры. Поскольку при рН 1,7 ФВК разрушает некоторые структуры клеток, можно использовать для позитивной окраски 1%-ю ФВК при рН 7,2 как при негативном способе окраски, с той разницей, что спустя 5—10 сек. после нанесения ФВК сетки с пленкой дважды тщательно отмывают в дистиллированной воде в течение 4—5 с. В этом случае фон остается светлым, а ФВК контрастирует объекты. В качестве протравы можно использовать уранилацетат, соли свинца, осмиевую кислоту и т.п. Контрастность бактериальных препаратов, обработанных таким образом, значительно повышается.

Для контрастирования объектов можно с успехом использовать раствор молибденовокислого аммония. Для этого готовят 2, 4 или 6%-й водный раствор при рН 7,0. Контрастирование производят так же, как при негативной окраске ФВК.

**Изготовление препаратов из грунта.** Подготовка суспензии ила для изготовления препарата состоит в следующем. Образец ила в соотношении 1:10 смешивают с 0,0004 N раствором NaOH и перемешивают 10 мин на магнитной мешалке. После 5-минутного отстаивания верхний слой жидкости используют для изготовления электронно-микроскопических препаратов. Суспензию фильтруют через крупнопористый мембранный фильтр, из фильтрата готовят препарат.

**Изготовление препаратов из проб воды и грунта для сканирующего микроскопа.** Преимущества использования сканирующего микроскопа перед трансмиссионным заключается в следующем:

- 1) в получении объемного изображения объекта;
- 2) в лучшем выявлении поверхностных структур клеток;
- 3) в выявлении способов прикрепления к твердому субстрату, колонизации поверхностей,
- 4) в исследовании естественных ассоциаций в природной среде обитания, в том числе на поверхности объектов, непрозрачных для электронного пучка, на частицах детрита, минералов, на песке и т.д.

Существует несколько способов приготовления препаратов для сканирующего микроскопа.

Наиболее распространен следующий способ: исследуемый материал из проб воды, бактериальной культуры, обрастаний или из образца грунта помещают путем фильтрации на ядерные фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. Можно наносить исследуемый материал на тонкое покровное стекло, оставляя его во влажной камере на несколько часов для прикрепления объектов к стеклу. После удаления влаги со стекла отсасыванием фильтровальной бумагой материал на фильтре стекла фиксируют в 2%-м глутаральдегиде, приготовленном на 0,05 М фосфатном буфере при рН 6,8 - 7,0. Осторожно отмывают фиксатор споласкиванием в дистиллированной воде в течение 10 мин и далее обезвоживают в серии растворов спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 75, 100%-й этанол) по 15 мин. После этого образцы высушивают при критической точке во фреоне 13 или в углекислоте и напыляют золотом. Препараты прикрепляют к столику микроскопа с помощью клея суперцемент.



В другой модификации процедуры приготовления препаратов используются специальные сосудики, изготовленные из стеклянной трубки диаметром 10 мм, нарезанной на отрезки длиной 10 мм. К нижней части каждого отрезка трубки с помощью силиконового клея прикрепляется фильтр с диаметром пор 0,1—0,2 мкм. В приготовленные таким образом сосудики помещается исследуемый материал, предварительно зафиксированный в смеси 2%-й четырехоксида осмия и насыщенного раствора сулемы в соотношении 6:1, пробы выдерживаются в фиксаторе 12—18 ч при 4°. После фиксации пробы переносят в сосудики и осторожно промывают 10 мин в воде. Вместо общепринятой процедуры обезвоживания в серии растворов спирта или ацетона производят однократное обезвоживание в метоксиэтаноле в течение 10 мин и далее в абсолютном этаноле 10 мин. Промывка материала водой и фиксация осуществляются путем погружения сосудиков в соответствующие жидкости. Это позволяет полностью сохранить на фильтре пробу и предохраняет материал от возможных повреждений. После обезвоживания пробы в сосудиках высушивают при критической точке в токе углекислоты. Затем фильтры с материалом напыляют золотом и исследуют в сканирующем микроскопе.

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Начем основаны методы световой и электронной микроскопии?
2. Как готовят препараты из проб воды и грунта?

## 1.12 ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

**Цель занятия.** Ознакомиться с основными методами окрашивания бактерий.

**Оборудование и материалы:** исследуемые пробы воды из водоёмов, исследуемые культуры микроорганизмов, краски, предметные и покровные стекла, микроскопы, спиртовки, сливные чашки, колбы с дистиллированной водой.

**Общие сведения.** Строение бактерий и других микроорганизмов лучше рассматривать на окрашенных препаратах. Исследуемую культуру наносят на чистое предметное стекло, подсушивают на воздухе, фиксируют физическим методом (проводя 2 - 3 раза через пламя спиртовки) и окрашивают одним из способов: Окраска эритрозином с докраской фуксином, окраска по Граму и др. После окраски мазок промывают проточной водой, высушивают и просматривают под микроскопом в капле иммерсионного масла.

Из красок наиболее часто используются метиленовая синь, кристаллвиолет, фуксин и эритрозин. За исключением эритрозина, основные растворы этих красок готовят на 95°-м этиловом спирте. Окраску мазка производят 1—3 мин, время от времени нагревая препарат до появления слабых паров.

**Окраска эритрозином с докраской фуксином**

*На фиксированный мазок наносят:*

1. Эритрозин, выдерживают 3 мин при слабом подогревании. Краску сливают.
2. Раствор фуксина, выдерживают 3 мин при слабом нагревании.

*Микроскопическая картина:* все микроорганизмы окрашиваются в красный цвет.

**Окраска по Граму** (*общепринятая модификация*) применяется при исследовании на любой вид инфекции. Микроорганизмы в зависимости от результатов окраски делят на две группы: грамположительные ( $Gp^+$ ) и грамотрицательные ( $Gp^-$ ).

На фиксированный мазок наносят:

1) полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет (генциановый фиолетовый). Выдерживают 1-2 минуты, после чего снимают бумажку, сливают краску, промывают водой. *При этом все микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет;*

2) раствор Люголя, выдерживают 1-2 минуты (мазок чернеет), краситель сливают, не промывают. *При этом у  $Gp^+$  микробов фиксируется фиолетовое окрашивание, т.к. образуется комплексное соединение генцианвиолета с йодом. Под действием спирта этот комплекс не разрушается, и микробы остаются фиолетового цвета;*

3) 96% этиловый спирт, выдерживают 30 секунд – 1 минуту. Тщательно промывают мазок. *При этом  $Gp^+$  остаются фиолетового цвета, а  $Gp^-$  обесцвечиваются, т.к. не удерживают основной краситель и вымывается спиртом.*

4) водный раствор фуксина или сафранина, выдерживают 1-2 минуты и промывают водой. При этом  $Gp^-$  микробы докрасиваются в красный цвет.

Мазок высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

*Микроскопическая картина:* грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный.

Окраску по Граму можно применять в видоизменении Синева, согласно которому вместо карболового генцианвиолета применяют окрашенные полоски фильтровальной бумаги\*. Для окрашивания мазков на фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной спиртовым раствором кристаллвиолета, и наносят 2-3 капли воды, которые полностью впитываются бумагой, последняя плотно прилегает к стеклу. Выдерживают 2 минуты, затем бумагу удаляют пинцетом и дальнейшую окраску производят по Граму.

\*Приготовление красящей бумаги по Синеву – В 100мл 96% этилового спирта растворяют 1 г кристаллвиолета и 1 см<sup>3</sup> глицерина. Краску наливают в лоток. Бумагу нарезают полосками шириной 2,0 – 2,5 см и длиной 30 – 50 см. Полоску погружают на несколько секунд в краску так, чтобы она окрасилась с обеих сторон. Окрашенные полоски вынимают пинцетом, дают краске стечь и подвешивают на шпагате для высушивания. Бумагу сушат на воздухе при комнатной температуре 18 – 23<sup>0</sup>С. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2×2 см и хранят в банке из темного стекла.

**Тест Гендерсона** применяется при определении принадлежности к грамположительным или грамотрицательным бактериям без окраски клеток.

*На чистое предметное стекло наносят:*

1. Каплю 3%-го водного раствора КОН.
2. Стерильной бакпетлей бактериальную культуру с агаровой среды или из осадка после центрифугирования.
3. Смешивают.

*Учет теста:*  $Gp^-$  - суспензия становится вязкой в течении 5 - 60сек.  $Gp^+$  - вязкости не наблюдается. Наилучший способ выявить вязкость суспензии - поднять петлей каплю на расстояние около 1 см над стеклом. Наличие слизистого тяжа ука-

зывает на принадлежность к грамотрицательным бактериям. На одном предметном стекле можно одновременно проанализировать 6—8 проб.

**Окраска спор.** Спора – это уплотненная часть цитоплазмы, покрытая многослойной оболочкой, пропитанная смолистыми и липидными веществами, содержащими большое количество кальция.

Некоторые палочковидные микроорганизмы образуют споры при неблагоприятных условиях внешней среды (почве, воде, питательных средах, кормах). При образовании споры цитоплазма клетки сгущается, сжимается, уменьшается свободная вода до 40% и покрывается многослойной оболочкой. Химический состав спор обеспечивает их высокую стойкость к нагреванию, высушиванию, действию кислот, щелочей, спиртов, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки. Споры (рисунок 21) имеют округлую или овальную форму, располагаются центрально, терминально или субтерминально. В диаметре они могут быть меньше или больше ширины клетки. Споры окрашивают сложными методами, т.к. они имеют плотную оболочку. Все методы окраски спор основаны на обеспечении проникновения красителя через трудноокрашиваемую оболочку споры. Перед окрашиванием изменяют порозность оболочки спор с помощью протравителей (соляную или хромовую кислоты) или раствор фенола при подогревании. При этом краситель хорошо адсорбируется, спора не обесцвечивается при воздействии кислотой. Вегетативные тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и докрасиваются при дополнительном окрашивании.

#### ***Окраска спор методом Ожешки***

*На чистое предметное стекло наносят мазок исследуемой культуры, подсушивают на воздухе и, не фиксируя, заливают:*

1. 5%-м раствором соляной кислоты, нагревают 2 мин до появления паров. Промывают водой.

2. Мазок покрывают фильтровальной бумагой и заливают карболовым фуксин-ом Циля, выдерживают 5 мин при легком подогревании до появления паров. При испарении краску подливают. Препарат не должен подсыхать. Промывают водой.

3. Обесцвечивают 1%-м раствором серной кислоты в течение 2 мин. Промывают водой.

4. Раствор метиленовой сини (1:40) выдерживают 10 - 15 мин. Промывают водой, высушивают.

*Микроскопическая картина:* бактериальные клетки синего цвета, споры - красного.

#### ***Окраска спор методом Шеффер—Фультон***

*На фиксированный спиртом мазок наносят:*

1. 5% водный раствор малахитовой зелени, выдерживают 1 мин. время от времени нагревая до появления слабых паров (3 - 5 раз). Смывают водой и осторожно просушивают фильтровальной бумагой.

2. 0,5% раствор сафранина, выдерживают 30сек., промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

*Микроскопическая картина:* споры окрашиваются в зеленый цвет, вегетативные клетки — в розовый.

### **Окраска спор методом Златогорова** (окрашивают без протравы).

На фиксированный мазок наносят:

1) кусок фильтровальной бумаги, окрашенный фуксином основным феноловым Циля, и капают 3-5 капель воды, окрашивают 5-7 мин при подогревании, нанося по каплям воду. *При этом вегетативные клетки и споры окрашиваются в красный цвет;*

2) 3% водный раствор серной кислоты на 5-10 сек и промывают водой. *Под действием серной кислоты вегетативные клетки обесцвечиваются, а споры остаются красными;*

3) раствор метиленовой сини, выдерживают 2-3 мин, промывают водой. *Синька метиленовая докрашивает вегетативные клетки в синий цвет.*

Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

*Микроскопическая картина:* споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в синий.

### **Окраска спор методом Пешкова**

На фиксированный мазок наносят:

1) метиленовый голубой Лёффлера, выдерживают 15-20 сек над пламенем спиртовки и промывают водой.

2) 0,5% водный раствор нейтральрота (нейтральный красный), выдерживают 30 сек, промывают водой.

Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

*Микроскопическая картина:* споры голубые или синие, молодые споры – черно-синие, вегетативные формы – розовые, включения (хроматиновые) - фиолетовые.

**Окраска капсул.** Капсула – толстый слизистый слой (муциноподобное вещество) вокруг микробной клетки состоящее из липополисахаридов, которое синтезируется в цитоплазме и секретруется на поверхность клеточной стенки.

Многие микроорганизмы способны к образованию капсулы поверх клеточной стенки. Капсулы выполняют важные функции во взаимодействии микроорганизмов с окружающей средой: защищают клетки от воздействия неблагоприятных факторов, служат барьером для проникновения фаговой инфекции и т.д. Важную роль капсульный материал играет в агрегировании и прикреплении к субстрату водных бактерий. В некоторых случаях в водоемах более 70% клеток в бактериопланктоне имеют капсулы.

Химический состав капсул неоднородный: одни из них состоят из комплекса белков, другие – из полисахаридов. У некоторых микроорганизмов, например у отдельных видов рода *Bacillus*, они состоят из полипептидов, у других из полисахаридов. Капсула слабо преломляет свет, поэтому в неокрашенных мазках их трудно обнаружить. Капсула и сама клетка имеют разный химический состав, поэтому при окрашивании одной краской красятся в различные цвета: бактериальная клетка красится в цвет применяемой краски, а капсула приобретает какой-либо оттенок. Существует несколько методов окрашивания капсул. Капсульное вещество плохо окрашивается. Поэтому при приготовлении препарата для обнаружения капсулы выполняют следующие правила:

1. Мазок готовят из свежего материала, так как капсула быстро лизируется.

2. Фиксируют мазок химическим способом, для окраски применяют метакроматические краски, то есть при использовании, которых цитоплазма окрашивается в один цвет, а капсула - в другой;

3. Промывать мазок водой следует слабо и кратковременно.

**Окраска капсул негативным методом** применяют для выявления капсул в световом микроскопе (черно-белое окрашивание).

*На чистое предметное стекло наносят:*

1. Каплю черной туши.
2. Каплю жидкой бактериальной суспензии.
3. Накрывают покровным стеклом.
4. Подсушивают на воздухе и исследуют под микроскопом.

*Микроскопическая картина:* на черном фоне четко выявляются бактериальные клетки и окружающие их прозрачные капсулы.

**Окраска капсул методом Гинса**

*На чистое предметное стекло наносят:*

1. Каплю черной туши.
2. Каплю жидкой бактериальной суспензии.
3. Фиксируют 7%-м раствором сулемы в течение 2—3 мин. или абсолютным метиловым спиртом или смесью эфира и этилового спирта в соотношении 1:15 в течение 10 мин. Промывают водой.
4. Водный раствор фуксина Циля (1:3), выдерживают 3 - 5 мин.

*Микроскопическая картина:* на темном фоне видны малиновые клетки, окруженные бесцветными капсулами.

**Окраска капсул методом Михина**

На фиксированный мазок наносят:

- 1) Метиленовый голубой Леффлера (лучше старым раствором), окрашивают 2-3 мин. при подогревании.
- 2) Промыть водой, обсушить.

*Микроскопическая картина:* тело микробной клетки темно-синего цвета, капсула – светло-розового.

**Окраска капсул методом Ольта**

На фиксированный мазок наносят:

- 2%-ный водный раствор сафранина\* (свежеприготовленный, горячий), окрашивают 1-3 минут.
- Промыть водой, обсушить.

*Микроскопическая картина:* тело клетки окрашивается в кирпично-красный цвет, капсула – в светло-желтый.

\*Раствор сафранина готовят перед употреблением: сафранин растворяют в воде, доведенной до кипения и фильтруют через бумажный фильтр.

**Окраска капсул методом Ребигера**

Окрашивают нефиксированные мазки. Мазки окрашивают и фиксируют одновременно. На мазок наносят:

- 1) Раствор Ребигера\*, выдерживают 15 – 20 сек.
- 2) Промыть водой, обсушить.

*Микроскопическая картина:* тело клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, а капсулы – в красно-фиолетовый.

\*Раствор Ребигера – берут 15-20 гр генцианвиолета растворяют в 100 см<sup>3</sup> 40%-ного формалина. Раствор оставляют на 8-10 ч при температуре 20<sup>0</sup>С, фильтруют, после чего он готов к употреблению.

### **Выявление включений в бактериальных клетках**

#### **Окраска гликогена.**

*На чистое предметное стекло наносят:*

1. Каплю исследуемой суспензии клеток.
2. Каплю раствора йода в йодистом калии и накрывают покровным стеклом.

*Микроскопическая картина:* зерна гликогена окрашиваются в красновато-коричневый цвет.

#### **Окраска волютина методом Омелянского.**

Волютин, или метахроматические зерна состоят из фосфолипидных комплексов и встречаются у некоторых микроорганизмов. В клетках дрожжей и грибов они сосредоточены в вакуолях, у бактерий — в цитоплазме.

*На фиксированный мазок наносят:*

1. Карболовый фуксин Циля, выдерживают 30сек. Промывают водой.
2. 1% раствор серной кислоты, выдерживают 20-30сек. Промывают водой.
3. Синьку метиленовую (1:40), выдерживают 1 мин. Промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

*Микроскопическая картина:* в поле зрения микроскопа видны красные зерна волютина на фоне протоплазмы, окрашенной в синий цвет.

#### **Окраска липидов.**

*На чистое предметное стекло наносят:*

1. Каплю 50%-го раствора формалина.
2. Каплю исследуемого материала и суспендируют 5 мин.
3. Каплю метиленового синего (1:40), выдерживают 10 мин.
4. Каплю судана III. Промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

*Микроскопическая картина:* цитоплазма клеток окрашивается в синий цвет, а жировые капли — в розовый.

### **Определение живых и мертвых бактерий.**

Для выявления в мазке мертвых бактерий рекомендуют производить окраску бактерий примулином, этазоловым желтым или бриллиантдионилковым зеленым в разведении 1:100000.

*На предметное стекло наносят:*

1. Несколько капель красителя (*примулин, этазоловый желтый или бриллиантдионилковый зеленый*).
2. Бакпетлём бактериальную суспензию.
3. Покрывают покровным стеклом. Избыток воды удаляют фильтровальной бумагой. Покровное стекло по краям обмазывают вазелином, чтобы предохранить препарат от высыхания. Через 5—10 мин препарат просматривают в люминесцентном микроскопе.

*Микроскопическая картина:* живые бактерии почти не светятся, а мертвые ярко люминесцируют. Одно и то же поле зрения сначала просматривают при люминесцентном освещении и учитывают мертвые клетки, а затем в том же поле зрения при фазовом контрасте подсчитывают общее количество бактерий.

### **Способы приготовления некоторых красок:**

#### **Эритрозин:**

Эритрозин	3 г
Карболовая вода, 5%-й водный раствор фенола	100 мл
Фуксин по Цилю	1 капля
Вода дистиллированная	10 мл

#### **Метиленовая синь по Леффлеру:**

Насыщенный спиртовой раствор метиленовой синей	30 мл
Раствор КОН в дистиллированной воде 1:10000	100мл

#### **Карболовый фуксин по Цилю:**

Насыщенный спиртовой раствор основного фуксина	10 мл
Карболовая вода, 5%-й водный раствор фенола	100мл

Перед окраской бактерий растворы разводят в 10 раз дистиллированной водой.

#### **Раствор йодистого калия с йодом:**

2г йодистого калия растворяют в 5мл дистиллированной воды, добавляют 0,7г кристаллического йода и дистиллированной водой доводят объем раствора до 30 мл.

#### **Раствор судана III:**

0,5 г краски судана III растворяют в 100 мл этанола или концентрированной молочной кислоты.

**Исследование микроорганизмов на подвижность.** Некоторые микроорганизмы в живом состоянии способны передвигаться. Различают пассивное (броуновское движение) и активное движение. Пассивное движение (броуновское) осуществляется током среды, в которой находятся микроорганизмы, например, с током воды или воздуха. Активное движение клеток приводится с помощью жгутиков, осуществляющих вращательные движения. Расположение их на теле микробной клетки различное. Жгутики бывают различной длины. Их диаметр настолько мал, что они невидимы в световом микроскопе (менее 0,2 мкм). У разных групп бактерий количество и расположение жгутиков неодинаково. Жгутики плохо воспринимают красители. Методы сложной окраски искажают подлинный вид жгутиков, поэтому в лабораториях окраску жгутиков не осуществляют, а исследуют бактерии в живом состоянии. Скорость и характер движения зависят от возраста культуры, окружающей среды и вида микроба. Молодые особи более подвижны, чем старые. С накоплением продуктов жизнедеятельности подвижность микроорганизмов прекращается. Подвижность микроорганизмов один из признаков при определении их вида.

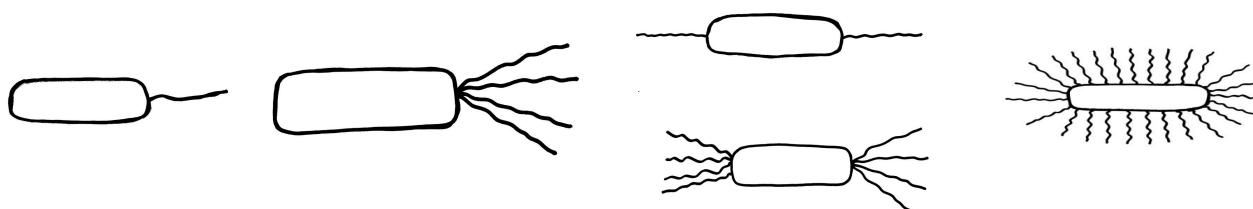
В зависимости от расположения и количества жгутиков микроорганизмы подразделяют на (рисунок 24):

а) монотрихи - микроорганизмы, имеющие на одном из полюсов один жгутик. Это самые подвижные бактерии, движения активные, поступательные (род *Pseudomonas*);

б) лофотрихи - микроорганизмы, имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков, движения активные, поступательные (род *Listeria*);

в) амфитрихи - микроорганизмы, имеющие по одному или несколько жгутиков на обоих полюсах микробной клетки, передвигаются беспорядочно;

г) перитрихи - микроорганизмы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки, передвигаются беспорядочно (*E. coli*).



а - монотрихи

б - лопотрихи

в - амфитрихи

г - перитрихи

**Рисунок 24** Типы расположения жгутиков у бактерий

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать молодые культуры (12 – 24 часовые), так как старые культуры утрачивают способность передвигаться. Исследование проводят путем приготовления препаратов «висячей» или «раздавленной» капли.

**Метод «висячая капля».** Висячую каплю готовят на предметном стекле с углублением (луночкой).

- 1) Берут чистое предметное стекло с луночкой;
- 2) Края луночки смазывают тонким слоем вазелина;
- 3) На покровное стекло наносят каплю исследуемой культуры.

Если они выращены в жидкой среде, берут каплю такой культуры, если на плотной, то сначала на покровное стекло наносят каплю изотонического раствора натрия хлорида, а затем в неё культуру микробов;

4) Предметное стекло проворачивают на 180° и аккуратно опускают на покровное так, чтобы капля оказалась в центре углубления, после чего его возвращают в прежнее положение. В таком препарате капля подвешена с внутренней поверхности покровного стекла и находится в герметически закрытой влажной камере. Это позволяет наблюдать за движением микробов в течение длительного времени;

5) Микроскопируют под увеличением  $\times 40$ , в слегка затемненном поле зрения микроскопа, что увеличивает контрастность неокрашенных форм.

**Метод «раздавленная капля»** служит для кратковременного наблюдения под микроскопом за морфологией и движением живых микробов.

- 1) Берут чистое предметное стекло;
- 2) Наносят каплю исследуемой взвеси;

3) Осторожно накрывают покровным стеклом без образования пузырьков воздуха. Слой жидкости должен быть такой толщины, чтобы стекла склеились. Если покровное стекло плавает, жидкость осторожно впитывают углом кусочка фильтровальной бумаги;

4) Микроскопируют под увеличением  $\times 40$ , в слегка затемненном поле зрения микроскопа, что увеличивает контрастность неокрашенных форм. Следует иметь в виду, что препарат быстро охлаждается и высыхает.

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. С какой целью окрашивают препараты?
2. Какие методы окраски Вы знаете?
3. Как исследуют микроорганизмы на подвижность?
4. Как готовят препарат «Висячая капля»?
5. Как готовят препарат «Придавленная капля»?



## 1.13 ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАПАХА, ВКУСА И ПРИВКУСА ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ.

**Цель занятия.** Изучить органолептические методы определения запаха, вкуса и привкуса воды.

**Оборудование и материалы:** колбы плоскодонные с притертыми пробками по ГОСТ 1770-74, вместимостью 250 - 350 см<sup>3</sup>; стекло часовое; баня водяная.

**Общие сведения.** Органолептический метод определения запаха, вкуса и привкуса исследуемой воды проводят согласно ГОСТ 3351-74 Вода питьевая. Методы определения вкуса, запаха, цветности и мутности.

Объем пробы воды не должен быть менее 500 см<sup>3</sup>. Пробы воды для определения запаха, вкуса, привкуса и цветности не консервируют. Определение производится не позднее, чем через 2 ч после отбора пробы.

### Органолептический метод определения запаха

Органолептическими методами определяют характер и интенсивность запаха. Характер запаха воды определяют ощущением воспринимаемого запаха по табл. 3. Запахи называются по соответствующим веществам: хлорфенольный, камфорный, бензиновый, хлорный, землистый, рыбный, травянистый и др. По характеру запаха делятся на две группы:

- *Запахи естественного происхождения* возникают от живущих в воде и отмерших организмов, от влияния почв и т.п.

- *Запахи искусственного происхождения* возникают от промышленных выбросов, от обработки воды реагентами и т.п.

Таблица 3

Классификация запахов воды естественного происхождения  
(СанПиН 2.1.5.980-00)

Символ	Характеристика запаха	Примерный род запаха
А	Ароматический	Огуречный, цветочный
Б	Болотный	Илистый, тинистый
Г	Гнилостный	Фекальный, сточных вод
Д	Древесный	Запах мокрой щепы, древесной коры
З	Землистый	Прелый, свежеспаханной земли, глинистый
П	Плесневый	Затхлый, застойный
Р	Рыбный	Рыбьего жира, рыбы
С	Сероводородный	Тухлых яиц
Т	Травянистый	Скошенной травы, сена
Н	Неопределенный	Запах естественного происхождения, не подходящий под предыдущие определения

Интенсивность запаха воды определяют при температуре 20°C и 60°C, оценивают по пятибалльной системе согласно требованиям таблицы 4.

*Определение запаха при 20°C.*

В колбу с притертой пробкой вместимостью 250 - 350 см<sup>3</sup> вносят 100 см<sup>3</sup> исследуемой воды температурой 20°C. Колбу закрывают пробкой, содержимое колбы

несколько раз перемешивают вращательными движениями, после чего колбу открывают и определяют характер и интенсивность запаха.

*Определение запаха при 60°C.*

В колбу с притертой пробкой вместимостью 250 - 350 см<sup>3</sup> вносят 100 см<sup>3</sup> исследуемой воды. Горлышко колбы закрывают часовым стеклом и подогревают на водяной бане до 50 - 60°C. Содержимое колбы несколько раз перемешивают вращательными движениями. Сдвигая стекло в сторону, быстро определяют характер и интенсивность запаха.

Таблица 4

Интенсивность, характер и оценка запаха воды

Интенсивность запаха	Характер проявления запаха	Оценка интенсивности запаха, балл
Нет	Запах не ощущается	0
Очень слабая	Запах не ощущается потребителем, но обнаруживается при лабораторном исследовании	1
Слабая	Запах замечаются потребителем, если обратить на это его внимание	2
Заметная	Запах легко замечаются и вызывают неодобрительный отзыв о воде	3
Отчетливая	Запах обращают на себя внимание и заставляют воздержаться от питья	4
Очень сильная	Запах настолько сильный, что делают воду непригодной к употреблению	5

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 запах воды должен соответствовать требованиям таблицы 5.

Таблица 5

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Запахи	Вода не должна приобретать запахи интенсивностью более 2 баллов, обнаруживаемые:	
	непосредственно или при последующем хлорировании или других способах обработки	непосредственно

### Органолептический метод определения вкуса и привкуса

Органолептическим методом определяют характер и интенсивность вкуса и привкуса. Оценку вкуса воды проводят у питьевой природной воды при отсутствии подозрений на её загрязненность.

Различают четыре основных вида вкуса: соленый, кислый, сладкий, горький.

Все другие виды вкусовых ощущений называются привкусами (солонватый, горьковатый, металлический, хлорный и т.п.).

Характер вкуса или привкуса определяют ощущением воспринимаемого вкуса или привкуса (соленый, кислый, щелочной, металлический и т.д.).

Исследуемую воду набирают в рот малыми порциями, **не проглатывая**, задерживают 3 - 5 с. При определении вкуса и привкуса воду не проглатывать!

Интенсивность вкуса и привкуса определяют при температуре 20°C и оценивают по пятибалльной системе согласно требованиям таблицы 6.

Таблица 6

Интенсивность, характер и оценка запаха, вкуса и привкуса воды

Интенсивность вкуса и привкуса	Характер проявления вкуса и привкуса	Оценка интенсивности запаха, балл
Нет	Вкус и привкус не ощущается	0
Очень слабая	Вкус и привкус не ощущается потребителем, но обнаруживаются при лабораторном исследовании	1
Слабая	Вкус и привкус замечаются потребителем, если обратить на это его внимание	2
Заметная	Вкус и привкус легко замечаются и вызывают неодобрительный отзыв о воде	3
Отчетливая	Вкус и привкус обращают на себя внимание и заставляют воздержаться от питья	4
Очень сильная	Вкус и привкус настолько сильный, что делают воду непригодной к употреблению	5

Для питьевой воды допускаются значения показателей вкуса и привкуса не более 2 баллов.

#### Вопросы для самоконтроля знаний:

1. Органолептический способ определения характера и интенсивности запаха воды.
2. Органолептический способ определения характера и интенсивности вкуса и привкуса воды.
3. Какие различают запахи воды по характеру?

## 1.14 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦВЕТНОСТИ ВОДЫ

**Цель занятия.** Изучить методы определения цветности воды.

**Оборудование и материалы:** термометр жидкостный стеклянный диапазоном измеряемых температур от 0 °С до 100 °С по ГОСТ 28498; Колбы мерные вместимостью 100 и 1000 см<sup>3</sup> 2-го класса точности по ГОСТ 1770; Пипетки с одной отметкой 2-го класса точности по ГОСТ 29169; Пипетки градуированные 2-го класса точности по ГОСТ 29227; Воронки лабораторные по ГОСТ 25336; Устройство для фильтрования проб с использованием мембранных фильтров; Фильтры мембранные с порами диаметром 0,45 мкм.; Измерительные трубки внутренним диаметром от 16 до 30 мм и длиной не менее 200 мм из бесцветного стекла с незатененным плоским дном и меткой, нанесенной на стенку трубок на расстоянии от 10 до 20 мм ниже

верхнего края, или специально изготовленные трубки, например трубки Несслера; Государственный стандартный образец (ГСО) цветности водных растворов с номинальным значением 500 градусов цветности по хром-кобальтовой шкале и относительной погрешностью аттестованного значения не более 2 % при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , соответствующий требованиям ГОСТ 8.315; Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.; Вода дистиллированная по ГОСТ 6709. *Примечание:* допускается применять другие средства измерений, аппаратуру, вспомогательные устройства, реактивы.

**Общие сведения.** Цветность является важным физико-химическим показателем качества питьевой воды, от которой зависят ее органолептические свойства.

Цветность воды обычно обусловлена присутствием окрашенного органического вещества (главным образом гуминовых и фульвовых кислот, связанных с гумусом почвы). На цветность воды сильно влияет присутствие железа и других металлов в виде естественных примесей или в качестве продуктов коррозии. Она бывает также обусловлена загрязнением водоисточника промышленными стоками и может служить первым признаком возникновения опасной ситуации. Для показателя цветности питьевой воды ВОЗ не устанавливает никакого конкретного значения, которое влияет на здоровье человека.

Цветность воды - условно принятая количественная характеристика для описания цвета природной и питьевой воды, имеющей незначительную естественную окраску. Цветность является косвенным показателем количества содержащихся в воде растворенных органических веществ. Измерение цветности природных вод необходимо для правильного выбора технологии водоподготовки.

Цветность воды определяется сравнением с растворами специально приготовленной шкалы цветности и выражается в градусах цветности этой шкалы согласно ГОСТ Р 52769-2007. Вода. Методы определения цветности.

Цветность устанавливают у питьевой и природной воды двумя методами:

1. Метод визуального определения цветности (метод А). Метод применяют только при необходимости ориентировочной оценки цветности;
2. Метод фотометрического определения цветности (метод Б) с применением хром-кобальтовой или платино-кобальтовой шкалы.

Методы определения цветности не применяют для анализа воды, содержащей примеси красителей или иных окрашенных химических веществ.

Пробу воды отбирают объемом не менее 200 см<sup>3</sup> в емкость, изготовленную из полимерных материалов или стекла.

Пробу не консервируют и анализируют как можно быстрее после отбора. Если анализ пробы воды проводят позднее, чем через 6 ч после ее отбора, то пробу хранят в темном месте при температуре от 2°C до 8°C, при этом срок хранения пробы - не более 24 ч.

*Примечание: пробы, хранившиеся в холодильнике, перед испытанием необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 2 ч.*

## Метод визуального определения цветности (метод А)

Метод основан на визуальном определении цветности анализируемой воды в градусах цветности путем сравнения пробы со шкалой цветности (хром-кобальтовой или платино-кобальтовой):  $0^0$ ;  $10^0$ ;  $20^0$ ;  $30^0$ ;  $40^0$ ;  $60^0$ ;  $100^0$ ;  $300^0$ ;  $1000^0$ .

### Проведение анализа

1. Колориметрическую пробирку (измерительную трубку) заполняют до метки пробой анализируемой воды, подготовленной в соответствии с инструкцией по применению.

2. Берут эталонные образцы хром-кобальтовой шкалы или вносят растворы шкалы цветности в колориметрические пробирки (измерительные трубки), заполняя их до метки.

3. Пробирки с исследуемой пробой воды и растворами шкалы цветности располагают над белой матовой поверхностью под таким углом, чтобы отраженный от поверхности свет проходил вверх через трубки с жидкостями.

4. Проводят сравнение цветности путем визуального осмотра измерительных трубок сверху на расстоянии 25 см от них при рассеянном дневном или электрическом свете, имитирующем дневной свет.

5. Цветность анализируемой пробы воды устанавливают по раствору шкалы цветности водных растворов, наиболее близкому по интенсивности окраски.

*Примечание:* если цветность анализируемой воды составляет более 70 градусов, то исходную пробу воды (объем  $V_{\text{п}}$ , см<sup>3</sup>) разбавляют дистиллированной водой таким образом, чтобы ее цветность после разбавления соответствовала диапазону шкалы цветности. Регистрируют объем разбавленной пробы воды ( $V_{\text{р}}$ , см<sup>3</sup>).

### Обработка результатов анализа

Значение цветности анализируемой пробы воды  $y$ , градусы цветности, устанавливают по действительному значению цветности для раствора шкалы цветности водных растворов или по значению цветности.

Цветность анализируемой пробы воды  $y$ , градусы цветности по формуле:

$$y = y_{\text{р}} F_{\text{р}}, \quad (1)$$

где  $y_{\text{р}}$  — значение цветности воды, градусы цветности;

$F_{\text{р}}$  — коэффициент разбавления, рассчитываемый по формуле

$$F_{\text{р}} = \frac{V_{\text{р}}}{V_{\text{п}}}, \quad (2)$$

где  $V_{\text{р}}$  — объем пробы воды, см<sup>3</sup>;

$V_{\text{п}}$  — объем исходной пробы воды, взятый до разбавления, см<sup>3</sup>.

### Оформление результатов анализа

Результаты анализа регистрируют в протоколе, указывая:

- метод определения цветности;

- результат  $y$  с указанием единиц измерений (градусы цветности по хром-кобальтовой (Cr-Co) или платино-кобальтовой (Pt-Co) шкале цветности) и температуры пробы анализируемой воды. Например, цветность —  $10^0$  цветности (Cr-Co),  $18^{\circ}\text{C}$ . *Примечание:* при определении цветности при постоянной комнатной температуре  $15-20^{\circ}\text{C}$  в конкретной лаборатории допускается по согласованию с заказчиком не указывать в протоколе значение температуры.

Для воды поверхностных водоемов этот показатель допускается не более 20 градусов по шкале цветности.

## Приготовление растворов хром - кобальтовой (Cr-Co) шкалы цветности

Растворы хром - кобальтовой шкалы цветности готовят в следующей последовательности: в мерные колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят государственный стандартный образец (далее ГСО) цветности водных растворов объемом, значения которого приведены в таблице 7, и доводят до метки раствором серной кислоты.

Таблица 7

Хром-кобальтовая шкала цветности в градусах цветности

Номинальное значение цветности водных растворов	Шкала цветности										
	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60	70
Объем аликвоты ГСО цветности водных растворов, см <sup>3</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14

### Примечания:

1 Допускается готовить растворы шкалы цветности (не менее пяти растворов) на участок диапазона, охватывающий рабочую область определения цветности анализируемых проб воды.

2 Допускается готовить растворы шкалы цветности из основного раствора, приготовленного в соответствии с требованиями ГОСТ Р 52769-2007 Методы определения цветности воды.

Основной раствор для хром-кобальтовой шкалы цветности готовят следующим образом: в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> растворяют в дистиллированной воде 0,0875 г двуххромовокислого калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 2г сернокислого кобальта (CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) и 1 см<sup>3</sup> серной кислоты (плотностью 1,84 г/см<sup>3</sup>) и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

Основной раствор соответствует 500 градусам цветности.

Срок хранения основного раствора — не более 3 месяцев.

Рассчитывают действительные значения цветности водных растворов в соответствии с инструкцией по применению ГСО с учетом его аттестованного значения.

Растворы шкалы цветности хранят в закрытой емкости в темном месте при температуре от 2°С до 8°С. Срок хранения растворов — не более 3 месяцев.

*Примечание:* растворы шкалы цветности, хранившиеся в холодильнике, перед испытанием необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 2 ч. Шкалы цветности являются равнозначными при применении.

Если цвет и оттенок образца воды не соответствуют модельным эталонным образцам хром-кобальтовой шкалы, то эти показатели оцениваются качественно, например: «окраска образца красно-коричневая».

### Метод качественного определения цветности

Если окраска воды не соответствует природному тону, а также при интенсивной естественной окраске, определяют высоту столба жидкости, при котором обнаруживается окраска, можно определять цветность воды качественно, характеризуя цвет воды в пробирке высотой 10–12 см (например, бесцветная, слабо-желтая, желтая, буроватая и т.д.).

#### Выполнение анализа

1. Заполните пробирку водой до высоты 10–12 см.
2. Определите цветность воды, рассматривая пробирку сверху на белом фоне при достаточном боковом освещении (дневном, искусственном). Отметьте наиболее подходящий оттенок из приведенных в таблице 8 либо заполните свободную графу.

Таблица 8

Цветность воды	
Слабо-желтоватая	Коричневатая
Светло-желтоватая	Красно-коричневатая
Желтая	Другая (укажите какая)
Интенсивно-желтая	

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 окраска воды должна соответствовать требованиям таблицы 9.

Таблица 9

## Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Окраска	Не должна обнаруживаться в столбике	
	20 см	10 см

### 1.15 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТНОСТИ И ПРОЗРАЧНОСТИ ВОДЫ

**Цель занятия.** Изучить методы определения мутности и прозрачности воды.

**Оборудование и материалы:** исследуемые пробы воды. Пробирка стеклянная высотой 10–12 см, лист темной бумаги (в качестве фона). Ламинированный образец шрифта (высота 3,5мм, ширина линии 0,35мм) или юстировочная метка (2 шт.). Пипетка для отбора воды. Пробирка или колба для определения прозрачности (длина 600 мм; диаметр 25 мм). Экран для пробирки. *Примечание.* Для устойчивости пробирку или колбу для определения прозрачности лучше закреплять в штативе.

**Отбор проб и подготовка к определению:** Пробы следует отбирать в стеклянные бутылки, закрывать пробками и проводить определение по возможности сразу же после отбора. Если же хранение неизбежно, пробы следует хранить в прохладном темном помещении, но не более 24ч., препятствовать контакту пробы с воздухом и избегать резкого изменения температуры. Если пробы хранятся при охлаждении, их необходимо перед анализом выдержать при комнатной температуре.

**Общие сведения.** *Мутность воды* обусловлена содержанием взвешенных в воде мелкодисперсных примесей – нерастворимых или коллоидных частиц различного происхождения. Мутность воды обуславливают и другие характеристики воды:

- наличие осадка, который может отсутствовать, быть незначительным, заметным, большим, очень большим, измеряясь в миллиметрах;
- взвешенные вещества, или грубодисперсные примеси, определяются гравиметрически после фильтрования пробы, по привесу высушенного фильтра. Этот показатель малоинформативен и имеет значение, главным образом, для сточных вод;
- прозрачность, измеряется как высота столба воды, при взгляде сквозь который можно различать узнаваемый знак (отверстия на диске, стандартный шрифт, крестообразная метка и т.п.).

Мутность определяют фотометрически (турбидиметрически – по ослаблению проходящего света или нефелометрически – по светорассеянию в отраженном свете), а также визуально – по степени мутности столба высотой 10–12 см в мутномерной пробирке и пробу описывают качественно следующим образом: прозрачная; слабо опалесцирующая; опалесцирующая; слабо мутная; мутная; очень мутная

Существует полевой метод определения мутности (а также прозрачности) воды с использованием специального диска, известного как диск Секки. Диск Секки представляет собой диск, отлитый из бронзы (или другого металла с большим удельным весом), покрытый белым пластиком или белой краской и прикрепленный к цепи (стержню, нерастягивающемуся шнуру и т.п.). Можно заменить диск Секи белой эмалированной крышкой от кастрюли соответствующего диаметра. Диск обычно имеет диаметр 200 мм с шестью отверстиями, каждое диаметром 55 мм, расположенными по кругу диаметром 120 мм. При определении мутности с помощью диска его опускают в воду настолько, чтобы он был едва заметен. Измеряют максимальную длину погруженной цепи (шнура), при которой диск еще заметен. Измерения повторяют несколько раз, т.к. возможно мешающее влияние отражения света от водной поверхности. Для значений, меньших 1 м, результат приводят с точностью до 1 см; для значений больших, чем 1 м, – с точностью до 0,1 м. Данный метод удобен тем, что позволяет использовать для анализа мосты, наклоненные над водой деревья, обрывистые берега и др. В некоторых случаях анализ можно проводить и с берега, привязав шнур к длинной палке.

**Прозрачность, или светопропускание, воды** обусловлена ее цветом и мутностью, т.е. содержанием в ней различных окрашенных и минеральных веществ. Прозрачность воды часто определяют наряду с мутностью, особенно в тех случаях, когда вода имеет незначительные окраску и мутность. Прозрачность определяют методом с использованием диска Секи, как и мутность воды, а также по высоте столба воды, который позволяет различать на белой бумаге стандартный шрифт. Следует отметить, что на прозрачность воды может влиять не только наличие взвешенных частиц, но и окраска (цветность) воды.

**Метод качественного определения мутности.** Проведение анализа:

1. Заполните пробирку водой до высоты 10–12 см.
2. Определите мутность воды, рассматривая пробирку сверху на темном фоне при достаточном боковом освещении (дневном, искусственном). Выберите подходящее из приведенных ниже:

- Мутность не заметна (отсутствует);
- Слабо опалесцирующая;
- Опалесцирующая;
- Слабо мутная;
- Мутная;
- Очень мутная.

**Метод количественного определения прозрачности**

Метод количественного определения прозрачности основан на определении высоты водяного столба, при которой еще можно визуально различить (прочсть) черный шрифт высотой 3,5 мм и шириной линии 0,35 мм на белом фоне или увидеть юстировочную метку (например, черный крест на белой бумаге). Проведению анализа могут мешать вещества, окрашивающие воду, а также пузырьки воздуха.



Проведение анализа:

1. Закрепить пробирку для определения прозрачности воды в штативе. Исследуемую пробу воды тщательно перемешать и поместить в пробирку. Пробирку закрыть от бокового света экраном и поместить на ламинированный образец шрифта или юстировочную метку.

2. Глядя сверху пробирки определить прозрачность исследуемой пробы воды при достаточном освещении сверху.

3. Отбирая воду пипеткой постепенно понижать её уровень до тех пор пока не станет видимым ламинированный образец шрифта или юстировочную метку.

4. Определить максимальную высоту жидкости  $h$  (мм) по делениям пробирки при которой различима метка.

5. Полученные данные об измерении высоты жидкости приводят с точностью до 10 мм.

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Чем обусловлена мутность и прозрачность воды?

2. Какими методами определяют мутность и прозрачность воды?

## 1.16 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕНИСТОСТИ ВОДЫ

**Цель занятия.** Изучить методику определения пенности воды.

**Оборудование и материалы:** исследуемые пробы воды, стеклянная колба объемом 0,5 л.

**Общие сведения.** *Пенистость* - способность воды сохранять искусственно созданную пену. Данный показатель может быть использован для качественной оценки присутствия таких веществ, как детергенты (поверхностно-активные вещества) природного и искусственного происхождения и др.

Пенистость определяют, в основном, при анализе сточных и загрязненных природных вод.

**Метод определения пенности воды.**

Проведение анализа:

1. Колбу объемом 0,5 л заполняют на 1/3 исследуемой водой.

2. Взбалтывают исследуемую пробу воды 30 сек.

Учет анализа: Проба считается положительной, если пена сохраняется более 1 мин. Величина рН воды при этой процедуре должна быть 6,5–8,5 (при необходимости воду нейтрализуют).

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое пенистость воды?

2. В каком случае возникает пенистость воды?

3. Как определяют пенистость воды.

## 1.17 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ

**Цель занятия.** Изучить методику определения температуры воды открытых водоемов.

**Оборудование и материалы:** калиброванный термометр, пробоотборник (для глубоководных измерений).

**Общие сведения.** Температура является важной гидрологической характеристикой водоема, показателем возможного теплового загрязнения. Измерения температуры воды необходимы также при выполнении некоторых гидрохимических анализов (растворенный кислород, БПК). Тепловое загрязнение водоема происходит обычно в результате использования воды для отвода избыточного тепла и сбрасывания воды с повышенной температурой в водоем. При тепловом загрязнении происходит повышение температуры воды в водоеме по сравнению с естественными значениями температур в тех же точках в соответствующие периоды сезона.

Тепловое загрязнение опасно тем, что вызывает интенсификацию процессов жизнедеятельности и ускорение естественных жизненных циклов водных организмов, изменение скоростей химических и биохимических реакций, протекающих в водоеме. В условиях теплового загрязнения значительно изменяются кислородный режим и интенсивность процессов самоочищения водоема, изменяется интенсивность фотосинтеза и др. В результате этого нарушается, часто необратимо, природный баланс водоема, складываются особые экологические условия, негативно сказывающиеся на животном и растительном сообществе.

Проводить измерение температуры следует в нескольких точках водоема, отстоящих друг от друга на несколько сот метров: в месте, где ожидается тепловое загрязнение, и в контрольной точке (температурный фон). Необходимо учитывать, что в выбранных точках должны быть близкие физические и гидрологические условия: скорость течения, глубина, продуваемость, освещенность солнцем и др. Если изучается проточный водоем, то точка контроля должна быть выше по течению.

Следует избегать измерения температуры в местах возможного естественного прогрева воды – на отмелях, в зарослях водных растений и т.п., так как в подобных местах температура обычно значительно превосходит общий температурный фон.

Температура воды определяется непосредственно на водоеме калиброванным термометром с ценой деления 0,1–0,5°C (в отдельных случаях оправдано измерение с ценой деления 1°C). Термометр устанавливают в пробоотборнике, который размещают на выбранной глубине, и выдерживают на нужной глубине не менее 5–10 мин, после чего пробоотборник поднимают и, не вынимая термометр, сразу же определяют температуру. При глубоководных измерениях необходимо использовать пробоотборники опрокидывающегося типа, заполняемые водой на требуемой глубине.

Температуру поверхностных слоев определяют, опуская термометр на глубину 15–20 см. Температура в поверхностных слоях воды может значительно (на 3–5°C и более) отличаться от температуры на глубинах в несколько метров. Предметом особого внимания должны быть впадающие в водоем реки, каналы и сточные канавы. При наличии впадающих в водоем притоков (сточных канав, ручьев, рек)

определите температуру также в зонах смешения воды в местах их впадения в водоем.

При наличии разницы в измеренных температурах в несколько градусов\* можно говорить о тепловом загрязнении водоема.

Погрешность измерения температуры можно свести к минимуму, выполняя следующие правила:

- для измерений используйте только калиброванный термометр\*\*;
- измеряйте температуру в разных точках одним и тем же термометром;
- результатом измерения считайте среднее арифметическое нескольких наблюдений.

### Определение температуры воды

1. Прогрузите термометр в воду непосредственно на водоеме не менее чем на одну треть шкалы и выдержите в погруженном состоянии на нужной глубине не менее 5 мин. Не вынимая термометра из воды, произведите отсчет показаний (с точностью до половины цены деления).

2. При изучении теплового загрязнения определите температуру воды ( $t, ^\circ\text{C}$ ) в нескольких местах водоема, отстоящих друг от друга не менее чем на несколько сот метров. Рассчитайте разницу в значениях температуры ( $\Delta t, ^\circ\text{C}$ ).

\*Разница в значении температуры  $3^\circ\text{C}$  или более свидетельствуют о тепловом загрязнении водоема.

\*\*Откалибровать термометр или проверить его точность можно, опустив его в тающий лед ( $0^\circ\text{C}$ ) и в кипящую воду ( $100^\circ\text{C}$ ).

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 температура воды должна соответствовать требованиям таблицы 10.

Таблица 10

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Температура	Летняя температура воды в результате сброса сточных вод не должна повышаться более чем на $3^\circ\text{C}$ по сравнению со среднемесячной температурой воды самого жаркого месяца года за последние 10 лет.	

### Вопросы для самоконтроля знаний:

1. Для чего необходимо измерять температуру воды открытых водоемов?
2. С помощью чего определяют температуру воды открытых водоемов?
3. Опишите методику определения температуры воды открытых водоемов?

## Раздел 2 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

### 2.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ЧИСЛА МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ

**Цель занятия.** Изучить методику определения общего числа микроорганизмов.

**Оборудование и материалы:** исследуемая вода, пробирки, колбы, пипетки градуированные, питательные среды, термостат.

**Общие сведения.** Метод определяет в исследуемой воде общее число микроорганизмов. К общему микробному числу (ОМЧ) относят количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), способные образовывать на питательном агаре колонии, при температуре 37°C в течение 24 ч (ОМЧ 37°C) и при температуре 22°C в течение 72 ч (ОМЧ 22°C), видимые при увеличении в 2 раза.

Общее число микроорганизмов не нормируется в воде водоемов, поскольку уровень этой группы микроорганизмов зависит от природных особенностей каждого объекта, времени года и т.п.

При выборе нового источника водоснабжения или места рекреации следует определять число колоний, вырастающих:

- при температуре 37°C в течение 24 ч;
- при температуре 22°C в течение 72 ч.

ОМЧ при температуре инкубации 37°C - индикаторная группа микроорганизмов, в числе которых определяют в большей мере аллохтонную микрофлору, внесенную в водоем в результате антропогенного загрязнения, в т. ч. фекального.

ОМЧ при температуре инкубации 22°C - индикаторная группа микроорганизмов, в числе которых, помимо аллохтонной, определяют водную микрофлору данного водоема (автохтонную).

При температуре 22°C вырастает больше сапрофитных микроорганизмов, чем при температуре 37°C. Соотношение численности этих групп микроорганизмов позволяет судить об интенсивности процесса самоочищения, активными участниками которого они являются. Эта разница более выражена при завершении процесса самоочищения (коэффициент соотношения ОМЧ 22°C : ОМЧ 37 °C равен четырем и выше). В местах загрязнения хозяйственно-бытовыми сточными водами численные значения обеих групп близки.

Показатель позволяет получать дополнительную информацию о санитарном состоянии водоемов, источниках загрязнения, процессах самоочищения.

При производственном контроле исходной воды, поступающей на сооружения водопроводных станций, определяют ОМЧ 37°C с целью установления эффективности очистки и обеззараживания.

#### ***Приготовление разведений***

Для посева объемов воды, меньших, чем 1 мл, используют разбавления анализируемой воды. Перед посевом растворы для разбавления (физраствор, пептонный раствор, пептонно-солевой раствор) разливают по 9 мл в пробирки с соблюдением правил стерильности. Затем в первую пробирку с 9 мл раствора вносят 1 мл анализируемой воды. При этом пипетка не должна быть опущена ниже поверхности воды,

чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. Другой стерильной пипеткой продуванием воздуха тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают из нее 1 мл и переносят в чашку Петри, что будет соответствовать посеву 0,1 мл анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов, этой же пипеткой переносят 1 мл содержимого первой пробирки в следующую пробирку с 9 мл раствора для разбавления. Другой стерильной пипеткой делают посев 1 мл из второй пробирки, что будет соответствовать посеву 0,01 мл анализируемой воды. В случаях высокого уровня загрязнения воды разбавление продолжают аналогично, каждый раз меняя пипетку.

Время от момента приготовления разведений и заливки питательным агаром не должно превышать 30 мин.

### ***Выполнение анализа***

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

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

Из каждой пробы делают посев 1 мл и по 1 мл из одного или двух разведений, выбирая объем воды для посева из расчета, чтобы не менее чем на 2-х чашках выросло от 20 до 300 колоний. Выбранный объем засевают в 2-х ч. Петри.

При исследовании заведомо чистых вод с содержанием сапрофитов до 300 КОЕ в 1 мл делают посеvy пробы воды без разбавления по 1 мл в 2 ч. Петри.

При исследовании воды неизвестной степени микробного загрязнения производят посев 3-4 десятикратных объемов, начиная с 1 мл.

После тщательного перемешивания пробы готовят разведения и немедленно вносят по 1 мл воды из пробы или из соответствующего разбавления в стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки, заранее промаркированные. Сразу же после внесения воды в каждую чашку вливают по 8-10 мл (на чашку диаметром 90-100 мм) расплавленного и охлажденного до 45-46°C питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержался. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

Расплавленный агар, на период проведения анализа, помещают в водяную баню или термостат, поддерживающие температуру 45 - 49°C.

Тонкий слой агара увеличивает эффективность учета сапрофитной микрофлоры водоемов за счет лучших условий для роста аэробных и факультативно анаэробных бактерий, преобладающих в водоемах. Колонии вырастают более крупные, легко подсчитываемые на фоне прозрачного тонкого слоя агара. Ограничен рост расплывчатых колоний.

После застывания агара две чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 37°C в течение 22 - 26 ч., а две другие чашки Петри с посевами инкубируют при температуре 20-22°C в течение 70 - 74 ч.

### ***Учет результатов***

Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Подсчет следует производить только в тех чашках, на которых выросли изолированные колонии в количестве от 20 до 300. При посеве 1 мл неразбавленной

воды ведут подсчет на чашках с любым количеством колоний, меньшим 300, и не менее чем в двух чашках.

Количество колоний на обеих чашках суммируют и делят на два. Результат выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды, округляя до 2-3 значимых чисел.

Если на одной из 2 чашек подсчет невозможен, результат выдают на основании учета колоний на одной чашке.

В протокол анализа заносят результат "число КОЕ ОМЧ 37 °С в 1 мл" или "число КОЕ ОМЧ 22 °С в 1 мл".

Результат можно представить на основании подсчета колоний на одной чашке (с отметкой в протоколе анализа), если на других чашках:

- а) рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки;
- б) число колоний превышает 300-500;
- в) при посеве из разбавлений выросло менее 20 колоний.

Если на всех чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространившийся на всю поверхность, или выросло более 300 колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают колонии на секторе чашки с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечают "число КОЕ ОМЧ в 1 мл ориентировочно".

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

Если подсчет невозможен из-за слишком многочисленного роста, то в протоколе записывают "сплошной рост".

В примечании отмечают особые обстоятельства, которые могут повлиять на результат (превышение срока хранения пробы, изменение температуры и времени инкубации посевов, отклонения от правил при учете результатов и т. д.).

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

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что относят к общему микробному числу (ОМЧ)?
2. Как нормируют ОМЧ в воде водоемов?
3. При выборе нового источника водоснабжения или места рекреации при какой температуре следует определять число колоний в питательной среде?
4. Как готовить разведения исследуемых проб воды?
5. Как проводят учет результатов исследований?

## **2.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОР СУЛЬФИТРЕДУЦИРУЮЩИХ КЛОСТРИДИЙ**

**Цель занятия.** Изучить методику определения спор сульфитредуцирующих клостридий в воде.

**Оборудование и материалы:** питательные среды для культивирования анаэробов, исследуемая вода, пробирки, колбы, пипетки градуированные, водяная баня, термостат.

**Общие сведения.** Сульфитредуцирующие клостридии - спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия до сульфидов на железосульфитном агаре при температуре 44°C в течение 16-18 ч.

В воде источников централизованного питьевого водоснабжения клостридии определяют в связи с использованием этого показателя для оценки эффективности обработки питьевой воды на этапах технологических процессов, поскольку споры сульфитредуцирующих клостридий являются более устойчивыми, чем вегетативные клетки бактерий к воздействию обеззараживающих агентов, а также неблагоприятных факторов, действующих на микроорганизмы в воде водоемов.

Общепринятым является представление о том, что клостридии указывают на давнее фекальное загрязнение. Однако длительность выживаемости этих споровых микроорганизмов в воде водоемов превышает таковую сальмонелл, что свидетельствует о наличии у этого показателя одного из наиболее важных свойств индикаторного микроорганизма.

#### **Выполнение анализа**

Споры сульфитредуцирующих клостридий определяют методом прямого посева.

Пробу воды 20-100 мл перед посевом прогревают на водяной бане при температуре  $(75 \pm 5)$  °С в течение 15 мин для исключения вегетативных форм (время отсчитывают после достижения указанной температуры).

Железосульфитный агар\* готовят и разливают небольшими порциями непосредственно перед посевом (повторному расплавлению агар не подлежит). В течение посева поддерживают среду нагретой до 70-80 °С в водяной бане.

Для посева выбирают 2-3 объема воды с таким расчетом, чтобы выросли изолированные колонии, ориентируясь на результаты, полученные ранее при анализе воды в этой же точке. Посевы вносят в стерильные пробирки и заливают горячим железо-сульфитным агаром высоким столбиком. Агар наливают по стенке пробирки во избежание попадания воздуха. Немедленно после заливки пробирки опускают в емкости с холодной водой для создания анаэробных условий в толще агара. После застывания посевы инкубируют при температуре 44 °С в течение 18-24 ч.

\*Железосульфитный агар - В 1000 мл стерильного расплавленного питательного агара добавляют 10 г глюкозы, нагревают до растворения, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при  $(112 \pm 2)$ °С 12 мин (основная среда). Непосредственно перед употреблением готовят 20 %-ный раствор сульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) и 8 %-ный раствор железа серно-кислого закисного ( $\text{FeSO}_4$ ) или железа хлористого ( $\text{FeCl}_2$ ) в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор сульфита натрия нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20 %-ного раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8 %-ного раствора серно-кислого железа, перемешивают и стерильно разливают во флаконы.

**Учет результатов** в соответствии с МУК 4.2.1.1018-00 "Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды". Количественному учету подлежат только те посевы, где получены изолированные колонии. Подсчитывают черные колонии, выросшие в толще питательной среды.

Результат анализа выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды.

При отсутствии роста черных колоний дают ответ «не обнаружено в 20 мл воды».

При невозможности учета колоний из-за сплошного роста результат оценивается как качественный, в протоколе отмечают «обнаружено в 20 мл». При необходимости получения количественного результата анализ повторяют.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое сульфитредуцирующие клостридии?
2. Для чего необходимо определять клостридии в воде источников централизованного питьевого водоснабжения?
3. На что указывает наличие клостридий в воде?
4. Каким методом определяют споры сульфитредуцирующих клостридий?
5. Как проводят учет результатов на исследование сульфитредуцирующих клостридий?

## **2.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СТАФИЛОКОККОВ**

**Цель занятия.** Изучить методику выявления стафилококков в воде.

**Оборудование и материалы:** мембранные фильтры, питательные среды, исследуемая вода, пробирки, колбы, пипетки градуированные, водяная баня, термостат.

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

При оценке качества воды индикаторами считают стафилококки, обладающие лецитовителлазной активностью, в основном *Staphylococcus aureus*. Сигнальное значение для регламентации нагрузки на зону купания имеет обнаружение свыше 10 стафилококков в 100 мл воды.

#### **Метод мембранных фильтров**

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

Фильтры помещают на желточносолевой агар\* и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

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

При необходимости подтвердить принадлежность таких бактерий к *Staphylococcus aureus* подозрительные колонии пересевают на желточносолевой агар бляшками, микроскопируют, определяют плазмокоагулазную активность. При наличии мелких грамположительных кокков, располагающихся в виде гроздей, и коагулировании плазмы дают положительный ответ.

Число колоний стафилококков делят на объем воды, профильтрованной через фильтры, на которых велся учет, и умножают на 100.

\*Желточносолевой агар - сухой питательный агар по указанию на этикетке и 65 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 1000 мл дистиллированной воды, разливают мерно в емкости, стерилизуют при  $(120 \pm 2)^\circ\text{C}$  20 мин. Перед употреблением в расплавленный и остуженный до 50-55°C солевой агар прибавляют один сте-



рильно приготовленный яичный желток, тщательно смешанный с 50 мл физиологического раствора с помощью стеклянных бус, перемешивают и разливают в чашки Петри тонким слоем по 12 - 15 мл. Допускается использовать сухой препарат промышленного производства (стафилококкагар).

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Для чего определяют наличие стафилококков в воде водоемов?
2. Какое количество стафилококков на 100 мл допускается в воде водоемов, предназначенных для купания?
3. Каким методом определяют наличие стафилококков в воде водоемов?

## **2.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ И ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ ТИТРАЦИОННЫМ МЕТОДОМ**

**Цель занятия.** Изучить общие (ОКБ) и термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ). Изучить методы определения общих и термотолерантных колиформных бактерий.

**Оборудование и материалы:** пробы исследуемой воды, лактозопептонная среда, агар Эндо, готовые бумажные тесты для определения оксидазы или реактив для оксидазного теста, фильтровальная бумага, термостат.

**Общие колиформные бактерии (ОКБ)** - грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

ОКБ - основной нормируемый показатель при оценке качества воды водоемов в местах водозаборов для централизованного водоснабжения, рекреации, в черте населенных пунктов. ОКБ - интегральный показатель степени фекального загрязнения, который включает термотолерантные колиформные бактерии, *E. coli*, и поэтому обладает индикаторной надежностью в отношении возбудителей бактериальных кишечных инфекций. ОКБ - наиболее чувствительный показатель при выявлении источников фекального загрязнения, в т. ч. небольших.

**Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)** входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре 44°C в течение 24 ч.

ТКБ рекомендуется определять одновременно в одном и том же посеве с ОКБ для подтверждения фекального происхождения загрязнения. Уровни ОКБ и ТКБ в воде водоемов, загрязняемых сточными водами, близки, различия находятся в пределах ошибки метода. По мере удаления от источника загрязнения и воздействия факторов самоочищения различия в численности этих групп индикаторов возрастают.

При высоком антропогенном, в частности, химическом загрязнении водоемов, сбросах недостаточно обеззараженных сточных вод, нарушении естественного статуса водоема (зарегулированные водоемы, каналы и т.п.) возможно снижение индикаторного значения лактозоположительных ОКБ и ТКБ в результате их более интенсивного отмирания, чем патогенных (сальмонеллы) и условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Если при этом центром Госсанэпиднадзора уста-

новлено несоответствие данных анализа по ОКБ и ТКБ (менее 1000 и 100 КОЕ соответственно) и неблагоприятной санитарно-гигиенической обстановки (нарушение режима в зонах санитарной охраны водопроводов, сброс сточных вод, урбанизации территорий водосбросов и т.п.), следует обратить внимание на рост лактозоотрицательных колоний, определить их принадлежность к бактериям семейства *Enterobacteriaceae* (по отрицательному оксидазному тесту и ферментации глюкозы до кислоты и газа) и включить их в число ОКБ при выдаче результата.

Титрационный метод может быть использован:

- при отсутствии материалов и оборудования, необходимых для выполнения анализа методом мембранной фильтрации;
- при анализе воды с большим содержанием взвешенных веществ;
- в случае преобладания в воде посторонней микрофлоры, препятствующей получению на фильтрах изолированных колоний общих колиформных бактерий.

#### **Выполнение анализа**

Объем воды для посева выбирают с таким расчетом, чтобы в минимальных объемах или в наибольшем разбавлении получить один или несколько отрицательных результатов. При этом следует ориентироваться на результаты предыдущих исследований воды в этом же месте водоема и на рекомендации МУК 4.2.1884-04 приведенных в таблице 11, а также таблиц расчета НВЧ (приложение А).

Таблица 11

Схема посева воды из различных объектов при работе титрационным методом

Объект исследования	Объем засеваемой воды (мл) для определения	
	колиформных бактерий	энтерококков
<b>Водоемы, не загрязняемые сточными водами</b>	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1	5 повторностей по: 50; 10; 1
	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1; 0,01	2 или 3 повторности по: 100; 10; 1; 0,1
<b>Водоемы, загрязняемые сточными водами</b>	2 или 3 повторности по: 1; 0,1; 0,01; 0,001	2 или 3 повторности по: 10; 1; 0,1; 0,01
<b>Водоемы в зоне влияния выпусков сточных вод</b>	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.

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

Каждый объем воды или ее разбавления засевают в лактозопептонную среду\*. Посев 10 мл анализируемой воды вносят в пробирки с 1 мл концентрированной лактозопептонной среды, 1 мл пробы воды и 1 мл из разбавлений вносят в пробирки с 10 мл среды нормальной концентрации.

*\* Лактозопептонная среда. Растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды 10 г пептона, 5 г натрия хлористого, 5 г лактозы. После растворения ингредиентов добавляют индикатор (2 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего), устанавливают рН (7,4-7,6), разливают по 10 мл в пробирки. 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. Готовую среду стерилизуют при  $t^{\circ}112^{\circ}\text{C}$  12 мин.*

Посевы инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

Полное отсутствие изменения среды позволяет дать отрицательный ответ.

Из посевов в среду накопления, где отмечено помутнение, образование кислоты и газа или только помутнение, производят высев петлей на сектора среды Эндо с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 16-18 ч.

### **Определение общих колиформных бактерий**

При наличии в среде накопления помутнения и газообразования, а при высеве на подтверждающую среду типичных для лактозоположительных колоний (темно-красных с металлическим блеском или без него), выполняют оксидазный тест\* или путем нанесения капель реактива на часть сектора. При обнаружении оксидазоотрицательных колоний дают положительный ответ на наличие ОКБ в данном объеме пробы.

*\*Оксидазный тест. Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают 2-3 каплями реактива для оксидазного теста. Бумажные системы промышленного производства смачивают дистиллированной водой. Подсчитывают типичные колонии каждого типа и по 3-4 - изолированные колонии, из них платиновой петлей или стеклянной палочкой (металлическая петля из никрома дает ложноположительную реакцию при работе с реактивом - тетраметил-п-фенилендиамином) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин появляется синевато-фиолетовое окрашивание штриха. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется. Примечание. Этим методом следует проводить определение оксидазной активности при получении чистых культур на среде Эндо.*

Наличие ОКБ требуется подтвердить:

- если в среде накопления имеет место сомнительная реакция (небольшое газообразование или только помутнение);
- если на среде Эндо выросли колонии с недостаточно четкими дифференциальными признаками лактозоположительных колиформных бактерий.

В этих случаях:

- проверяют наличие отпечатка на среде Эндо после снятия петлей подозрительных колоний;
- подтверждают способность к газообразованию при посеве изолированных 1-2 колоний каждого типа с каждого сектора на среду с лактозой с последующей инкубацией посевов при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

При отсутствии изолированных колоний проводят рассев на среду Эндо общепринятыми бактериологическими методами. Отрицательный ответ дают, если: в среде накопления нет признаков роста; на секторах среды Эндо нет роста; на секторах среды Эндо выросли не характерные для колиформных бактерий колонии (про-

зрачные, с неровными краями, расплывчатые, а также розовые без отпечатков на среде и т. п.); все колонии оказались оксидазоположительные; если в подтверждающем тесте на среде с углеводом не отмечено газообразования.

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 количество общих колиформных бактерий в воде должна соответствовать требованиям табл. 12.

Таблица 12

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Общие колиформные бактерии *	не более 1000 КОЕ / 100 мл*	не более 500 КОЕ / 100 мл

\*Для централизованного водоснабжения; при нецентрализованном питьевом водоснабжении вода подлежит обеззараживанию.

**Определение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ)**

Для определения ТКБ работают с секторами среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии, а в среде накопления обнаружено газообразование. Делают посев 2-3 изолированных колоний каждого типа с каждого сектора в пробирки с любой из лактозных сред. Среду перед посевом нагревают на водяной бане или в термостате до 44°C. Немедленно после посева пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре 44°C в течение 24 ч. Допускается предварительный просмотр посевов через 4-6 ч.

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

Для ускорения выдачи ответа на присутствие ТКБ производят высеивание 1 мл из объемов среды накопления, где отмечено помутнение и газообразование, в пробирки с лактозо-пептонной средой и поплавком или ваткой по п. 2.4.7.2 и прогретой предварительно до температуры 44 °С. Посевы выдерживают в термостате при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 24 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ.

**Учет результатов**

После определения положительных и отрицательных результатов на наличие ОКБ, ТКБ в объемах воды, засеянной в среду накопления, вычисляют наиболее вероятное число (НВЧ) КОЕ в 100 мл по одной из таблиц приложения А, соответствующих схеме посева и полученным результатам.

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

В протоколе анализа указывают: НВЧ КОЕ ОКБ в 100 мл, НВЧ КОЕ ТКБ в 100 мл. Доверительный интервал не указывают.

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 количество термотолерантных колиформных бактерий в воде должна соответствовать требованиям таблицы 13.

Таблица 13

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Термотолерантные колиформные бактерии *	не более 100 КОЕ / 100 мл*	не более 100 КОЕ / 100 мл

\*Для централизованного водоснабжения; при нецентрализованном питьевом водоснабжении вода подлежит обеззараживанию.

**Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое ОКБ и ТКБ?
2. Какими методами определяют наличие ОКБ и ТКБ в воде водоемов?
3. Каким требованиям должно соответствовать количество ОКБ и ТКБ?

## 2.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИФАГОВ

**Цель занятия.** Изучить методику определения колифагов прямым методом.

**Оборудование и материалы:** тест культура *E. coli* K<sub>12</sub> F<sup>+</sup> Str-r; термостат, водяная баня, счетчик колоний, пробирки микробиологические, штативы для пробирок, чашки Петри, пипетки градуированные, спиртовки, бактериологические петли, агар микробиологический, агар питательный сухой, сухой питательный бульон, физраствор, смесь агара с тест культурой *E. coli* K<sub>12</sub> F<sup>+</sup> Str-r.

**Отбор, хранение и транспортирование проб.** Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или стерильные 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, должны 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 применяют), и стерильным колпачком. При заполнении емкостей должно оставаться пространство между пробкой и поверхностью воды, чтобы пробка не смачивалась при транспортировании. *Поверхностные пробы* отбирают с глу-

бины 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. 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).

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

- 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°C. 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 транспортировки и хранения время начала исследований от момента отбора проб не должно 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 температуры хранения, анализ пробы по бактериологическим показателям не проводят.

**Определение колифагов прямым методом.** **Колифаги** - бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса (бляшки) при температуре культивирования 37°C через 16 - 20 ч на питательном агаре. Колифаги являются нормируемым показателем и предназначены для проведения текущего контроля качества воды поверхностных водоемов, служащих источником для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, водоснабжения пищевых предприятий, для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест.

**Подготовка тест-культуры *E. coli* ( $K_{12}F^+$  Str-r).** Культуру *E. coli* засевают в пробирку со скошенным питательным агаром со стрептомицином и инкубируют при температуре 37°C 16 – 18ч. Затем с поверхности скошенного агара смывают бактерии 5 мл стерильного физраствора и готовят взвесь *E. coli* (по стандарту мутности) в концентрации  $10^9$  бактериальных клеток в 1 мл.

Допускается в день анализа внести культуру *E. coli* в питательный бульон и инкубировать при 37°C в течение 4 ч, а затем использовать при внесении в расплавленный и охлажденный до 43 - 45°C питательный агар.

*Приготовление смеси агара с культурой E. coli.* В питательный агар, расплавленный и охлажденный до 43 - 45°C вносят культуру E. coli из расчета 1 мл смыва на 100 мл агара, перемешивают.

*Контроль тест-культуры E. coli на обсемененность посторонними колифагами.* В стерильную чашку Петри вносят 10 мл стерильной водопроводной воды температурой 20-25°C и заливают 25 мл смесью агара с культурой E. coli (43 - 45°C). Содержимое чашек осторожно перемешивают и оставляют при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром помещают вверх дном в термостат при температуре 37°C на 16 – 20 ч. В контрольной чашке бляшки должны отсутствовать.

### **Выполнение анализа**

Объем воды для посева выбирают в зависимости от степени ее загрязнения с таким расчетом, чтобы на чашках выросло до 300 бляшкообразующих единиц (БОЕ). Исследуемые объемы воды вносят в стерильные чашки Петри и заливают, слегка приоткрывая крышки, 25 мл смеси агара с культурой E. coli. Содержимое чашек осторожно перемешивают и оставляют при комнатной температуре до застывания. Чашки с застывшим агаром помещают вверх дном в термостат при температуре 37°C на 16 – 20 ч (предварительный просмотр через 5 – 6 ч).

*Учет реакции.* Просмотр посевов осуществляется в проходящем свете. Предварительный учет результатов проводят через 5-6 ч инкубации. При наличии четких зон лизиса дают предварительный ответ о присутствии колифагов в воде.

Окончательный количественный учет прямого посева проводится через 16 – 20 ч. Результаты выражают количеством бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 100 мл воды.

Число колифагов вычисляют по формуле:

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

*a* - сумма бляшек на чашках;

*V* - объем исследуемой воды.

При исследовании разведений, число колифагов в 100 мл воды вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot p_1 + a \cdot p_2 + a \cdot p_3}{3} 100, \text{ где}$$

*a* - сумма бляшек на чашке,

*p<sub>1,2,3</sub>* - разведение.

*3* - количество разведений (в данном примере их 3 - *p<sub>1</sub>*, *p<sub>2</sub>*, *p<sub>3</sub>*).

Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 мл воды.

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

### **Постановка контролей**

"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. С этой целью, в зависи-

мости от посевной дозы исследуемой воды, в стерильную чашку Петри вносят от 1 до 20 мл стерильной водопроводной воды, заливают смесью МПА (мясопептонного агара) с *E. coli* и инкубируют 16 – 20 ч при 37°C.

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

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

Для проверки культуры на лизогенность необходимо использовать новую пробирку с культурой, хранящейся на полужидком агар. В стерильную чашку Петри помещают 1 мл бактериальной взвеси и заливают расплавленным и охлажденным до 45-49°C питательным агаром, инкубируют при температуре 37 °С в течение 16-20 ч.

Просмотр посевов осуществляют в проходящем свете. Наличие зон лизиса в контрольном посеве свидетельствует о спонтанно проявившемся свойстве культуры продуцировать фаги или контаминации ее колифагом в процессе работы.

Использование в работе лизогенной культуры запрещается. Необходимо получить новую лиофилизированную культуру.

#### **Методика подтверждения фаговой природы лизиса**

В сомнительных случаях необходимо провести контрольный посев на подтверждение фаговой природы лизиса.

С этой целью бактериологической петлей извлекают участок агара с бляшкой колифага, вызывающей сомнение, помещают его в 5 мл питательного бульона, куда добавляют каплю тест-культуры *E. coli* и инкубируют при 37 °С в течение 16 - 20 ч. Полученную культуру обрабатывают хлороформом или фильтруют через мембранный фильтр и исследуют на наличие фага. Высев осуществляют петлей или пипеткой на поверхность питательного агара, содержащего взвесь *E. coli*, чашки инкубируют в термостате при 37 °С в течение 16 – 20 ч. Наличие зон лизиса на поверхности агара расценивается как подтверждение наличия фага.

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 количество колифагов в воде должно соответствовать требованиям таблицы 14.

Таблица 14

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
Колифаги *	не более 10 БОЕ / 100 мл*	не более 10 БОЕ / 100 мл

\*Для централизованного водоснабжения; при нецентрализованном питьевом водоснабжении вода подлежит обеззараживанию.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Что такое колифаги?
2. Как выполняют анализ колифагов прямым методом?
3. Для чего проводят подтверждение фаговой природы лизиса?
4. Каким требованиям должно соответствовать количество колифагов в воде?



## 2.6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ

**Цель занятия.** Изучить методику определения патогенных бактерий семейства Enterobacteriaceae рода Salmonella

**Оборудование и материалы:** питательные среды для культивирования сальмонелл, исследуемые пробы воды, колбы, пробирки, пипетки градуированные, термостат.

**Общие сведения.** В соответствии с требованиями СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод" об отсутствии патогенных микроорганизмов в местах водопользования, контроль воды поверхностных водоемов осуществляют по определению бактерий рода Salmonella семейства Enterobacteriaceae и учитывают их отсутствие в 1000 мл воды как наиболее устойчивых из патогенных представителей этого семейства. Анализ на выделение других возбудителей инфекционных заболеваний с водным путем передачи выполняют только по эпидпоказаниям. Бактерии рода Salmonella определяют:

- при выборе новых источников водоснабжения и зон рекреации;
- при установлении влияния выбросов сточных вод на водоем;
- при превышении нормативов по ОКБ (общие колиформные бактерии) и ТКБ (термотолерантные колиформные бактерии) и в повторно отобранных пробах;
- при ухудшении санитарно-гигиенической обстановки (появление новых источников загрязнения, при метеорологических условиях, приводящих к смыву загрязнений с прилегающих территорий, экстремальных ситуациях и т.п.);
- при неблагоприятной санитарно-гигиенической и эпидемической ситуации.

Частоту контроля определяют в каждом конкретном случае в соответствии с программой центров госсанэпиднадзора. В водоемах, где уровни индикаторных микроорганизмов в местах водозаборов соответствуют требованиям СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод", периодический контроль на обнаружение сальмонелл необходимо предусмотреть: при несоблюдении режимов в зонах санитарной охраны водозаборов, особенно при сбросах недостаточно обеззараженных сточных вод; при химическом загрязнении; в водоемах с нарушенным естественным статусом (водохранилищах, каналах, нижних бьефах ГЭС и др.). При этом необходимо иметь в виду более длительные сроки выживаемости сальмонелл по сравнению с колиформами и, следовательно, снижение их индикаторного значения.

При обнаружении сальмонелл в местах рекреации необходимо рассмотреть вопрос о закрытии пляжа.

При обнаружении сальмонелл в местах водозаборов централизованного питьевого водоснабжения следует принять меры по усилению режимов очистки и обеззараживания, а при контроле их эффективности иметь в виду большую устойчивость сальмонелл в процессах обеззараживания по сравнению с ОКБ и ТКБ.

### **Выполнение анализа**

Для определения сальмонелл исследуют 1000 мл воды водоемов, засевая по 500 мл в две из следующих сред накопления: селенитовый бульон, магниевая среда, среда Мюллера-Кауфмана, тетраэтилатная среда по Preuss и другие апробированные для этих целей среды накопления.

### *Посев воды для определения сальмонелл методом мембранной фильтрации*

Для посева 2 объемов по 500 мл отбирают 1000 мл воды. Каждый объем профильтровывают через один или несколько мембранных фильтров. Полученные фильтры из каждого объема помещают в 50-100 мл в любые две из перечисленных сред накопления. При затрудненной фильтрации большого объема пробы следует на фильтр с диаметром пор 0,45 мкм наложить фильтр с большим диаметром пор для задержания взвешенных частиц с последующим помещением на питательную среду обоих фильтров.

#### **Ход анализа**

Посевы воды в среды накопления инкубируют при температуре 37°C в течение 18-20 ч. При обнаружении роста (помутнения) производят высев бактериологической петлей на две чашки с висмут-сульфитным агаром. Рассев производят одним из методов получения изолированных колоний. Чашки с посевами инкубируют при температуре 37°C в течение 18-20 ч.

На висмут-сульфитном агаре колонии сальмонелл круглые, черные, с металлическим блеском, с сероватым металлическим ободком вокруг колоний, так называемое "зеркало", зеленые с темным центром и без него, вызывающие потемнение среды под колонией.

При дальнейшей работе с культурами сальмонелл возможно использование SS агара. На SS-агаре колонии сальмонелл вырастают бесцветными. Колонии нежные, гладкие, круглые, слегка выпуклые с ровными краями, блестящие, полупрозрачные, диаметром 1,0-2,0 мм.

В отличие от патогенных бактерий, *E. coli* образуют круглые, выпуклые, гладкие, малинового цвета колонии.

При обнаружении колоний, подозрительных на сальмонеллы, по 4-5 изолированных колоний с каждой чашки снимают для посева в пробирки с комбинированными средами для определения биохимических свойств, подтверждающих принадлежность к родам *Salmonella* (типа Клиглера, Олькеницкого и др.).

Окончательное определение биохимических и серологических свойств сероваров проводят по действующим инструкциям.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. По определению каких бактерий осуществляют контроль воды поверхностных водоемов?
2. В каком объеме воды учитывают отсутствие бактерий рода *Salmonella*?
3. В каких случаях проводят контроль поверхностных вод на обнаружение сальмонелл?
4. Какими методами определяют наличие сальмонелл?

## Раздел 3 САНИТАРНО-ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ

### 3.1 САНИТАРНО-ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ

**Цель занятия.** Изучить основные санитарно-паразитологические методы исследования воды поверхностных водоемов.

**Оборудование и материалы:** прибор для фильтрования типа ПВФ-142, ПМФ-70, УППВ; мембранные фильтры типа МФАС-СПА с размерами пор 1,5-3,0 мкм, МФАС-СПА-4 с размерами пор 2,4-4,5 мкм, прозрачные АТМ с размерами пор 1,0-3,05. префильтры - капроновая сетка с ячейками 60-70 мкм; лотки, эмалированные кастрюли или ведра, акварельные кисточки, пинцеты. *Примечание:* допускается к использованию оборудование с аналогичными характеристиками, разрешенное к применению для этих целей в установленном порядке.

**Реактивы:** 33%-ный водный раствор семиводного сульфата цинка ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ) - 331 г  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  растворить в 1 л кипящей дистиллированной воды. После охлаждения до комнатной температуры измерить удельную плотность ареометром, которая должна быть не менее 1,25-1,26; или 30 %-ный водный раствор сахарозы - 300 г сахарозы растворяют в 1 л горячей дистиллированной воды; 1 %-ный раствор Люголя; 6-8 %-ный раствор формалина; дистиллированная вода.

**Общие сведения.** Санитарно-паразитологическое исследование воды предназначено для обнаружения в воде цист патогенных простейших кишечника (лямблий, криптоспоридий, амебы дизентерийной, балантидия) и яиц гельминтов, представляющих непосредственную угрозу для здоровья человека при их заглатывании, при осуществлении контроля качества воды по паразитологическим показателям в источниках хозяйственно-питьевого водоснабжения и в водоемах рекреационного назначения.

Отбор проб воды производят в чистые емкости. Сосуды больших объемов (молочные фляги, металлические и пластмассовые ведра и т.п.) тщательно промывают кипяченой водой и ополаскивают отбираемой для анализа водой. Пробы воды необходимо брать в створах, расположенных выше и ниже сброса стоков, у причалов, мест стоянок пассажирских и грузовых судов, выше и ниже населенных мест, в зонах рекреации, оздоровительных детских, спортивных и военных лагерей, по берегам и в середине водоема. Поверхностные пробы отбирают с поверхности водоема, а также с различных глубин, начиная с 10-15 см от поверхности воды или от нижней кромки льда. Глубинные пробы можно отбирать с помощью пробоотборника гидробиологического типа "Пробоконг", снабженного погружным насосом, в соответствии с инструкцией по применению или другого с аналогичными характеристиками, разрешенного к применению в установленном порядке. Пробы воды с поверхности водоема следует отбирать емкостями 1,5-2,0 л с интервалами 3-5 мин. Это позволяет в течение 40-60 мин взять усредненную пробу объемом 25 л. Пробы воды могут доставляться в лабораторию без обработки или, в целях облегчения их транспортирования, после предварительной обработки (концентрирования материала пу-

тем фильтрования на месте отбора проб, в лаборатории водопроводной станции и др., с использованием типа ПВФ-142 полевая модификация).

С этой же целью может быть использована методика первичной концентрации паразитарных патогенов с помощью таких коагулянтов, как сульфат аммония, сульфат железа, сульфат меди в дозе 0,1-0,3 г/л. В пробу воды на месте отбора добавляют коагулянт, затем тщательно перемешивают и отстаивают 1-2 ч. После этого надосадочную жидкость удаляют, а осадок переносят в сосуд объемом 1 л и доставляют в лабораторию. Содержимое этого сосуда вновь отстаивают 1-2 ч, а осадок после удаления надосадочной жидкости переносят в центрифужные пробирки 10-50 мл (в зависимости от объема осадка) и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют 3 мл 1%-ного раствора хлористоводородной кислоты для растворения хлопьев коагулянта, перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок обрабатывают по нижеописанной методике.

Пробы, не прошедшие предварительную обработку, хранят при температуре 15-20°C не более двух суток. В случае если первичная обработка пробы воды (фильтрование) проводилась вне лаборатории, использованные фильтры помещают в широкогорлый флакон или стеклянную банку, добавляют 30-50 мл исходной воды; закрывают флакон или банку завинчивающейся или притертой крышкой, маркируют, указывают дату, место отбора, количество профильтрованной воды и транспортируют в лабораторию для дальнейшего исследования. При невозможности исследования в день отбора материал хранят при 4°C не более суток; при отсутствии необходимости определения жизнеспособности цист кишечных простейших и яиц гельминтов материал хранят при 4°C не более 3-4 суток после добавления в него формальдегида с таким расчетом, чтобы концентрация его в суспензии составила 2%.

**Исследование воды открытых водоемов.** Берут 0,5-5-10 л воды, процеживают через планктонную сетку или фильтровальную бумагу. Осадок с фильтра скабливают острым скальпелем, смешивают с каплями 5%-ного водного раствора глицерина и микроскопируют. Если осадок густой, то его можно исследовать по методу Фюллеборна.

**Метод Фюллеборна.** В фарфоровую ступку помещают 5-8 г (можно 10-20 г) осадка, заливают небольшим количеством насыщенного раствора натрия хлорида (400 г соли на 1 л воды) и тщательно растирают. Затем в смесь добавляют 150-200 мл раствора и, размешивая стеклянной палочкой, процеживают через сито в сухой чистый стакан. Взвесь отстаивают 10-15 мин. С поверхности отстоявшейся жидкости бактериальной петлей снимают пленку, переносят ее на предметное стекло и микроскопируют.

**Флотационный метод исследования воды.** Цисты патогенных простейших кишечника и яйца гельминтов обнаруживаются при микроскопическом исследовании осадка, получаемого после центрифугирования не менее 4-кратно разведенного раствора флотанта с плотностью 1,26, в который искомые паразитарные агенты попадают из осадка, смываемого с мембранных фильтров после фильтрации через них исследуемой воды. Осаждение цист простейших и яиц гельминтов происходит за счет резкого снижения плотности флотанта, которая после разведения достигает 1,03 и менее, что ниже плотности паразитарных агентов.

Исследуемую пробу воды фильтруют через мембранные фильтры типа МФАС-СПА или прозрачные аналитические трековые мембраны (АТМ) в соответствии с инструкцией.

Весь полученный смыв с мембранных фильтров или после концентрации хим-реактивами центрифугируют в пробирках емкостью 10 мл и более в течение 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают.

Добавляют 6-8 мл 2%-ного водного раствора формалина (или дистиллированной воды) и размешивают.

Суспензию вновь центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин.

Надосадочную жидкость осторожно сливают или отсасывают пипеткой.

К осадку добавляют 3 мл одного из флотантов с удельным весом не менее 1,26 (33%-ный водный раствор семиводного сульфата цинка или 30%-ный водный раствор сахарозы и т. п.) и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

Центрифугируют в течение 5 мин при 2000 об/мин или 10 мин при 1500 об/мин.

Надосадочную жидкость осторожно сливают или отсасывают пипеткой и переносят в центрифужную пробирку, разбавляя в 4 раза дистиллированной водой, и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин.

Надосадочную жидкость осторожно сливают. Из осадка готовят препараты на предметных стеклах и микроскопируют под покровным стеклом при увеличении: объектив 10х-40х, окуляр 10х. Для исследования на цисты лямблий микропрепараты окрашивают раствором Люголя.

При микроскопии и идентификации паразитарные патогены в пробах воды необходимо дифференцировать от фитопланктона и гидробионтов.

**Метод с применением прозрачных аналитических трековых мембран.** Аналитическая трековая мембрана - тонкая прозрачная полиэтилентерефталатная пленка со сквозными порами диаметром от 0,1 до 5,0 мкм.

Выпускаются диски мембран диаметром (25; 37; 47; 70; 142мм), в соответствии с используемыми в лаборатории фильтровальными приборами. При первичном использовании трековых мембран их микроскопируют до фильтрации, чтобы ознакомиться с формой и расположением пор. Для фиксации диска трековой мембраны (или его фрагмента) на поверхность предметного стекла наносят 1-2 капли 50%-ного раствора глицерина. Затем сверху накладывают трековую мембрану или ее фрагмент в виде полоски (размером с предметное стекло) и накрывают покровным стеклом. Микроскопируют при увеличениях: окуляр 7х или 10х; объектив 10х или 40х. На трековой мембране будут хорошо видны сквозные поры в виде круглых образований с ровными краями без содержимого (напоминают пузырьки). Дифференцировка пор трековой мембраны с паразитологическими объектами не представляет затруднений, т. к. размеры яиц гельминтов в 10-20 раз, а цист лямблий в 2-4 раза превышают размеры пор. Поры трековых мембран имеют четкие контуры, не имеют внутреннего содержимого и при микроскопии занимают все поля зрения.

*Подготовка трековых мембран к фильтрации.* Трековую мембрану (которая находится между бумажными прокладочными дисками, изготовленными из силиконизированной бумаги) извлекают пинцетом из заводской упаковки и помещают на фритту фильтродержателя прибора для фильтрования (диаметр диска трековой мембраны подбирают в зависимости от имеющейся в лаборатории фильтровальной ус-

тановки), закрепляют крышкой или в корпусе и проводят фильтрацию пробы воды в соответствии с инструкцией к прибору. При фильтрации мутной, с видимыми загрязнениями, воды необходимо использовать предфильтры (прилагаемые к прибору для фильтрации или к набору аналитических трековых мембран).

*Микроскопия аналитических трековых мембран.* После фильтрации пробы воды, трековую мембрану извлекают пинцетом, помещают в чашку Петри или эмалированный лоток поверхностью, которая прилегала к фритте.

Затем, придерживая трековую мембрану за края пинцетом, не задевая поверхности фильтрации во избежание нарушения целостности препарата и потери искоемых патогенов, разрезают ее на отдельные полоски, размер которых соответствует размеру предметного стекла. Диски трековых мембран диаметром 25; 37; 47 мм можно микроскопировать на больших предметных стеклах не разрезая их на части.

Полоску трековой мембраны, поверхностью, которая прилегала к фритте, помещают на предметное стекло, предварительно обработав его 50%-ным раствором глицерина (для этого на поверхность предметного стекла наносят 1-2 капли 50%-ного раствора глицерина и стеклянной палочкой распределяют по всей поверхности). Всю поверхность полоски трековой мембраны накрывают сверху покровными стеклами (24×24 мм). Микроскопируют при увеличениях: окуляр 7х или 10х; объектив 10х или 40х.

При исследовании на цисты лямблии, на полоску трековой мембраны, которая уже помещена на предметное стекло с глицерином, наносят сверху каплю 1%-ного раствора Люголя и накрывают покровными стеклами (24×24 мм) всю поверхность полоски. Микроскопируют при увеличениях: окуляр 7х или 10х; объектив 40х.

Использование прозрачных аналитических трековых мембран облегчает санитарно-паразитологический анализ воды и значительно сокращает время его проведения. Их использование может проходить по двум вариантам:

первый - трековые мембраны применяют при пробоподготовке воды и выполнении вышеописанной стандартной методики в соответствии с МУК 4.2.964-00 "Санитарно-паразитологические исследования воды хозяйственного и питьевого использования";

второй - отфильтрованный с помощью трековой мембраны осадок непосредственно микроскопируют на ней в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава России N 22 ФЦ/3314 от 26.03.03 "Использование прозрачных аналитических трековых мембран для санитарно-паразитологических исследований воды"

Примечание: При использовании трековых мембран на приборах вакуумного фильтрации (ПВФ-142 и др.) необходимо учитывать, что толщина диска трековой мембраны меньше стандартных мембранных фильтров МФАС-СПА, что может послужить причиной отсутствия вакуума. Для избежания погрешности, перед укладкой диска трековой мембраны на фритту, по краю фильтродержателя укладывают уплотнительные кольца, которые прилагаются к каждой стандартной заводской упаковке трековых мембран.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний:**

1. Для чего проводят санитарно-паразитологическое исследование воды?
2. Как проводят исследование воды открытых водоемов на наличие паразитов?
3. Какова методика Фюллеборна?
4. Что такое флотационный метод исследования воды?

### 3.2 САНИТАРНО-ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ НА НАЛИЧИЕ ЦИСТ ЛЯМБЛИЙ, ЯЙЦА И ЛИЧИНКИ ГЕЛЬМИНТОВ, ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДИЙ

**Цель занятия.** Методика предназначена для обнаружения в воде ооцист криптоспоридий, а также может использоваться для определения цист лямблий и яиц гельминтов.

**Оборудование и материалы:** прозрачные аналитические трековые мембраны (АТМ) с диаметром пор 5,0 и 2,5 мкм и капроновая сетка (префильтр) с диаметром пор 25,0; префильтр (капроновая сетка) с диаметром пор 67-70 мкм; прибор для фильтрования типа ПВФ-142; ПВФ-35; ПНФ-70; пинцеты, кисточки акварельные (широкие, мягкие или полужесткие), пластмассовые пластины, лотки, эмалированные кастрюли или ведра.

**Реактивы:** краска по Циль-Нильсену - фуксин основной 2 г растворить в 12 мл спирта 96 %; фенола 5 г растворить в 50 мл дистиллированной воды; слить вместе растворы фуксина и фенола, долить дистиллированной воды до 100 мл и тщательно перемешать; дистиллированная вода.

**Метод последовательной фильтрации через систему аналитических трековых мембранных фильтров (АТМ)**

**Исследование на цисты лямблий, яйца и личинки гельминтов.** Предварительно на заборное устройство прибора для фильтрования ПВФ-142 крепится префильтр в виде капроновой сетки с размерами ячейки 67-70 мкм (поставляется в комплекте с АТМ).

Аналитическую трековую мембрану (АТМ) с диаметром пор 5,0 мкм помещают на фритту\* фильтродержателя прибора для фильтрования и сверху укладывают фильтр с размером пор 25,0 мкм, уплотняют кольцом из эластичной резины. Далее закрепляют крышкой и проводят фильтрацию в соответствии с инструкцией к прибору. Необходимо профильтровывать пробу воды в отдельную емкость, т. к. она будет подвергаться повторной фильтрации.

После фильтрации обе мембраны последовательно по одной осторожно снимают пинцетом с фритты на заранее подготовленные тонкие пластмассовые квадратные пластинки размером 150×150 мм<sup>2</sup> (поставляются в комплекте с АТМ) и переносят в лоток.

Профильтрованную в отдельную емкость пробу воды повторно фильтруют с использованием АТМ с диаметром пор 2,5 мкм, которую укладывают на фритту\* фильтродержателя между двумя уплотнительными кольцами из полиэтилена или обрезиненного лавсана (поставляются в комплекте с АТМ).

После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом с фритты на заранее подготовленные тонкие пластмассовые квадратные пластинки размером 150×150 мм<sup>2</sup> (поставляются в комплекте с АТМ) и переносят в лоток.

Со всех трех фильтров аккуратно и тщательно, придерживая диск с мембраной пинцетом за край, производят смыв осадка с обеих поверхностей мембран и с пластиковых дисков, на которых эти фильтры лежали. Смыв проводят плоской, средней жесткости кисточкой (поставляемой в комплекте с АТМ) в лоток с дистиллированной водой. При этом периодически споласкивают мембраны и диски дистиллиро-

ванной водой из химического стакана. Общий объем дистиллированной воды при смыве осадка со всех 3 фильтров не должен превышать 300-500 мл.

Концентрированный смыв сливают из лотка в воронки прибора для фильтрации типа ПВФ-35 или ПВФ-47 и фильтруют через АТМ с диаметром пор 2,5 мкм. В зависимости от первоначальной загрязненности воды используют 1-2 или 3 воронки. Если прибор с одной воронкой, то фильтруют последовательно, меняя мембраны.

После фильтрации АТМ осторожно снимают пинцетом и переносят на предметное стекло, предварительно обработав его 50%-ным раствором глицерина (для этого на поверхность предметного стекла наносят 1-2 капли 50 %-ного раствора глицерина и стеклянной палочкой распределяют по всей поверхности), затем сверху мембраны наносят каплю 1 %-ного раствора Люголя и накрывают покровным стеклом (24×24 мм) всю поверхность мембраны.

Микроскопируют при увеличениях: окуляр 7х или 10х; объектив 10х; для идентификации яиц гельминтов и исследования на цисты лямблий - объектив 40х.

\* Для плотного (без складок) прилегания АТМ к фритте рекомендуется:

а) АТМ вместе с калькой уложить мембраной на фритту и провести ладонью несколько раз по кальке. За счет появления электростатики мембрана прилипнет к фритте, а калька легко отделится от мембраны;

б) смочить фритту и мембрану дистиллированной водой и плотно уложить АТМ на фритту без кальки.

**Исследование на ооцисты криптоспоридий.** После проведения фильтрации через АТМ с диаметром пор 2,5 мкм на приборе типа ПВФ-35 или ПВФ-47, полученного концентрированного смыва, мембрану(ы) тщательно высушивают в лотке на воздухе.

Затем окрашивают АТМ в кювете (лотке, чашке Петри) карболовым фуксином (краска по Циль-Нильсену) в течение 20 мин.

После окраски фильтры промывают под проточной водой, предварительно закрепив АТМ за край химического стакана, с таким расчетом, чтобы струя воды не попадала на поверхность мембраны, а закрепленный фильтр свободно плавал в воде. Фильтр считается промытым, когда из стакана польется прозрачная вода.

Затем обесцвечивают (дифференцируют) 5-10 %-ной серной кислотой, в течение 10-20 с и снова промывают под проточной водой, предварительно закрепив АТМ за край химического стакана, с таким расчетом, чтобы струя воды не попадала на поверхность мембраны, а закрепленный фильтр свободно плавал в воде. Фильтр считается промытым, когда из стакана польется прозрачная вода.

Затем дополнительно окрашивают 0,2 %-ным водным раствором метиленового синего или 5 %-ной малахитовой зелени в 10 %-ном этиловом спирте в течение 3-5 мин (при отсутствии этих ингредиентов данный этап можно исключить). Промывают под струей проточной воды, предварительно закрепив АТМ за край химического стакана, с таким расчетом, чтобы струя воды не попадала на поверхность мембраны, а закрепленный фильтр свободно плавал в воде. Фильтр считается промытым, когда из стакана польется прозрачная вода.

Пинцетом фильтр из воды переносят в кювет (лоток, чашку Петри) и тщательно высушивают на воздухе.

Окрашенный фильтр (АТМ) помещают на предметное стекло, предварительно смазанное иммерсионным маслом (для лучшей адгезии), накрывают покровным



стеклом и микроскопируют под иммерсией при увеличении микроскопа: окуляр 10х, объектив 90х или 100х.

*Микроскопическая картина:* Ооцисты криптоспоридий окрашиваются в разные оттенки ярко красного (малинового, вишневого) цвета и имеют вид округлых образований диаметром 5-6 микрон с отчетливо видимой оболочкой и структурированным содержанием (можно наблюдать наличие 4 веретенообразных темно-окрашенных спорозоитов) на синем или зеленом основном фоне.

Примечание. Для определения в воде цист лямблий и ооцист криптоспоридий при наличии в лабораториях специального оборудования, иммунореагентов, химреактивов может быть использован метод иммуномагнитной сепарации с флуорохромами.

**Идентификация выявленных возбудителей кишечных паразитарных болезней.** При микроскопировании подсчитывают число паразитарных патогенов во всем объеме осадка, что соответствует их числу во всей исследованной пробе. Одновременно определяют систематическую принадлежность обнаруживаемых паразитических организмов; идентификация их проводится по следующим признакам.

*Цисты лямблий* - овальная форма, размеры 10-14 мк в длину и 6-10 мк в ширину; незрелые цисты содержат 2 ядра, зрелые - 4; ядра находятся у переднего полюса цисты. Оболочка цисты отчетливо выражена и большей частью отстает от протоплазмы, что является одним из характерных отличий цист лямблий от цист других простейших. Внутри цисты вдоль по средней линии проходят две опорные нити - аксостили; в косом или поперечном направлении лежат характерные парабазальные тела (2 - в незрелых и 4 - в зрелых цистах), нередко заметен сложно свернутый жгутиковый аппарат. Плотность - 1,06-1,09.

*Цисты амебы дизентерийной* - округлая, редко овальная форма, размеры от 10 до 16 мк; молодые цисты содержат 1-2 ядра с центрально расположенной звездчатой кариосомой, зрелые цисты содержат 4 ядра, в зрелых четырехъядерных и незрелых двухъядерных цистах ядра расположены в различных плоскостях; оболочка цист двухконтурная в виде светлого прозрачного ободка. Одноядерные цисты почти всегда содержат в большом количестве гликоген, который в виде крупной вакуоли с нерезкими очертаниями занимает обычно больше половины цисты и раствором Люголя окрашивается в темно-коричневый цвет. Плотность - 1,08-1,1.

Следует иметь в виду, что в природной воде могут встречаться цисты *Entamoeba dispar*, идентичные цистам дизентерийной амебы, но не обладающие патогенными свойствами для человека. В этом случае следует в протоколе исследования отмечать находки без указания видовой принадлежности таких цист. Для идентификации их необходимы дополнительные специальные исследования. Однако и в данной ситуации должна быть настороженность в отношении эпидемического неблагополучия.

*Цисты Балантидия кишечного* - правильная круглая форма, плотная двухконтурная оболочка, средний размер около 50 мк. Внутри цист имеется крупное бобовидное ядро. Протоплазма однородна, гликоген в ней распылен равномерно. Под оболочкой в некоторых цистах заметно углубление, представляющее собой редуцированный цитостом - органеллу, соответствующую началу пищеварительной трубки многоклеточных. Ресничный покров отсутствует. Плотность - 1,1.

*Яйца аскариды человеческой (свиной)* - оплодотворенные яйца овальной или шаровидной формы. Наружная оболочка крупнобугристая, толстая, коричневого цвета (иногда встречаются яйца без наружной бугристой оболочки). Размеры яиц 50-70×40-50 мк. Яйцеклетка мелкозернистая и шаровидная, расположена в центре яйца. Плотность - 1,10-1,14.

Зрелое яйцо (способное заразить при заглатывании) содержит внутри подвижную личинку, свернувшуюся кольцевидно или перекрестно.

*Яйца токсокары (аскариды собачьей)* - почти круглые, 65-75 мк в диаметре, с нежноячеистой наружной толстой оболочкой темно-коричневого цвета, внутри яйца видна округлая зародышевая клетка. Зрелые инвазионные яйца содержат внутри подвижную свернувшуюся кольцом или перекрестно личинку. Плотность - 1,22.

*Яйца власоглава* - симметричные, имеют лимонообразную или бочонковидную форму. Оболочка темно-коричневая, толстая. На обоих полюсах имеются светлоокрашенные пробковидные образования. Размеры яиц 50-54×23-26 мк. В зрелых инвазионных яйцах видна подвижная личинка. Плотность - 1,16-1,22.

*Яйца острицы* - асимметричные. Одна сторона заметно уплощена, другая выпукла. Размеры яиц 50-60×30-32 мк. Оболочка тонкая, гладкая и бесцветная. Яйца могут быть на различных стадиях созревания, до головастикоподобной личинки включительно. Плотность - 1,14.

*Яйца цепня карликового* - оболочка яйца бесцветная, тонкая, гладкая. Форма овальная. Размер яиц 40×50 мк, эмбриофора (зародыш) почти шаровидная (29×30 мк), с длинными нитевидными придатками на полюсах. Плотность - 1,12.

*Онкосферы тениид (цепня свиного и эхинококков)* - овальная форма, размеры 31-40×20-30 мк; имеют тонкую наружную оболочку и толстую радиально-исчерченную внутреннюю оболочку темно-коричневого цвета. Внутри онкосферы находится зародыш-эмбриофора с шестью зародышевыми крючьями. Плотность - 1,24.

Отрицательный результат анализа не гарантирует отсутствия паразитарных патогенов в пробе, поэтому результат исследования должен представляться в протоколе термином "не обнаружены". Обнаружение даже одного экземпляра паразитарных патогенов в 1 пробе питьевой воды указывает на эпидемическое неблагополучие в системе питьевого водоснабжения.

**Визуальная оценка вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших кишечника и яиц гельминтов.** Оценка вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших и яиц гельминтов визуально проводится по следующим критериям, подтверждающим жизнеспособность:

- целостность наружной оболочки (отсутствие ее разрывов, вдавлений, вздутия, сморщивания);

- четкая внутренняя структура цисты или яйца - у цист четко видны ядра, отсутствует зернистость. У цист лямблий, кроме того, видны аксостили, жгутиковый аппарат, медиальное тело. Для яиц гельминтов (аскарид, токсокар, власоглавы, остриц) характерно наличие дробящейся зародышевой клетки или подвижной личинки. У живых онкосфер тениид и карликового цепня зародышевые крючья расположены попарно, а у мертвых - беспорядочно;

- при окраске препарата 1%-ным водным раствором эозина жизнеспособные цисты лямблий не воспринимают окраску в течение первых 5 мин, мертвые окраши-

ваются сразу же в розовый цвет. Поэтому указанную окраску следует использовать до микроскопии только в том случае, когда на изучение препарата потребуется не более 5 мин. Часто просмотр мазка длится 15-30 мин, тогда 1 %-ный водный эозин можно вводить аккуратно, не сдвигая препарат под покровное стекло пипеткой в точке, где при предварительном просмотре уже обнаружены цисты лямблий;

- жизнеспособность онкосфер тениид и яиц аскарид, содержащих личинку, определяют путем окрашивания препарата смесью, содержащей метиленовый синий. Живые онкосферы тениид, а также личинки, находящиеся внутри яиц аскарид, не окрашиваются в течение первых 15 мин. Мертвые окрашиваются сразу в синий цвет;

- жизнеспособность онкосфер тениид можно также определить по движению зародышей при воздействии на них пищеварительными ферментами. Для этого исследуемый осадок, содержащий онкосферы, помещают на часовое стекло в искусственный дуоденальный сок. Стекло ставят в термостат при 36-38 °С на 4 ч. Живые зародыши освобождаются от оболочек, а мертвые - нет;

- оболочки жизнеспособных онкосфер растворяются также в подкисленном пепсине (рН 5-6) и в щелочном растворе трипсина (рН 8-8,5) через 6-8 ч при температуре 38 °С.

Схема выполнения методики санитарно-паразитологического исследования воды и изображения определяемых с ее помощью цист кишечных простейших и яиц гельминтов представлены в приложении Б, В, Г.

Согласно санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.5.980-00 жизнеспособные яйца гельминтов, онкосферы тениид и жизнеспособные цисты патогенных кишечных простейших в воде должны соответствовать требованиям таблицы 15.

Таблица 15

Требования к свойствам воды водных объектов

Показатель	Категория водопользования	
	Для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, а также для водоснабжения пищевых предприятий	Для рекреационного водопользования, а также в черте населенных мест
жизнеспособные яйца гельминтов (аскарид, власоглав, токсокар, фасциол), онкосферы тениид и жизнеспособные цисты патогенных кишечных простейших	не должны содержаться в 25 л воды	

#### Вопросы для самоконтроля знаний:

1. Как проводят исследование воды на цисты лямблий, яйца и личинки гельминтов?
2. Как проводят исследование воды на ооцисты криптоспоридий?
3. Как проводят идентификацию выявленных возбудителей кишечных паразитарных болезней?
4. Как проводят визуальную оценку вероятной жизнеспособности цист патогенных простейших кишечника и яиц гельминтов?

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ОБЛАСТИ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

**Автоматический отбор проб воды** - Отбор проб воды без участия человека по разработанной программе.

**Автономная система питьевого водоснабжения** - Устройства и сооружения, предназначенные для забора, подготовки или без подготовки питьевой воды, с подачей или без подачи ее к местам потребления, находящиеся в пользовании физических лиц и закрытые для общего пользования

**Агломерация** - Соединение мелких хлопьев или частиц взвешенных веществ с образованием больших хлопьев или частиц взвешенных веществ в воде.

**Агрессивность воды** - Способность воды и растворенных в ней веществ разрушать путем химического воздействия различные материалы

**Азот по Кьельдалю** - Суммарная массовая концентрация органического и аммонийного азота в пробе воды, определяемая после воздействия на пробу серной кислотой при заданных условиях.

**Аммонизация воды** - Процесс добавления аммиака при водоподготовке.

**Анаэробные организмы (анаэробы)** - Организмы, не требующие для выживания или размножения присутствия растворенного или газообразного кислорода.

**Артезианская вода** - Напорная подземная вода, заключенная в глубоких водоносных пластах между водонепроницаемыми слоями.

**Аэробные организмы (аэробы)** - Организмы, требующие для выживания или размножения присутствия растворенного или газообразного кислорода.

**Бактериофаг** - Вирус, способный инактивировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней и вызывать ее лизис или переход в лизогенное состояние.

**Биологическая индикация воды** - Оценка качества воды по наличию водных организмов, являющихся индикаторами ее загрязненности

**Биологическое тестирование воды** - Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами

**Биота** - Живые компоненты экосистемы.

**Биохимическое потребление кислорода (БПК)** - Количество растворенного кислорода, потребляемого за установленное время и в определенных условиях, при биохимическом окислении содержащихся в воде органических веществ

**Бихроматная окисляемость** - Химическое потребление кислорода при обработке пробы воды бихроматным ионом при определенных условиях.

**Бытовые водоочистные устройства** - Водоочистные устройства, эксплуатируемые и обслуживаемые самими потребителями.

**Взвешенные вещества в воде** - Вещества, выделенные из воды путем фильтрации и (или) центрифугирования.

**Вибрионы** - Грамотрицательные оксидазоположительные водные бактерии, имеющие форму изогнутых палочек, способные передвигаться с помощью жгутиков. *Примечание:* Некоторые виды вибрионов патогенны для человека (например, *Vibrio cholera* и *Vibrio parahaemolyticus*).

**Вирусы** - Группа ультрамикроскопических внутриклеточных паразитов, состоящих из нуклеиновой кислоты, окруженной защитной протеиновой или смешанной оболочкой из протеинов, липидов и углеводов.

**Водные сапрофитные микроорганизмы** - Гетеротрофные микроорганизмы, использующие для питания органические вещества, в том числе продукты жизнедеятельности и останки организмов.

**Водоочистные устройства** - Технические изделия, предназначенные для очистки, доочистки, обеззараживания воды с целью улучшить ее качество для питьевых и бытовых нужд человека.

**Водоросли** - Группа одно- или многоклеточных низших водных растений, включая цианобактерии.

**Вторичное загрязнение вод** - Загрязнение вод в результате превращения внесенных ранее загрязняющих веществ, массового развития организмов или разложения мертвой биологической массы

**Гельминты** - Группа червей-паразитов, вызывающих гельминтозы. *Примечание:* Яйца гельминтов - стадия жизненного цикла, обеспечивающая выживание вне хозяина, распространение и передачу заболевания.

**Гетеротрофность** - Тип питания, при котором в качестве источника углерода используются органические соединения.

**Гигиенические нормативы качества питьевой воды** - Совокупность научно обоснованных и установленных санитарными правилами предельно допустимых значений показателей органолептических свойств, содержания химических веществ и микроорганизмов в питьевой воде, гарантирующих безопасность и безвредность питьевой воды для жизни и здоровья человека независимо от продолжительности ее использования.

**Гигиенический критерий качества воды** - Критерий качества воды, учитывающий токсикологическую, эпидемиологическую и радиоактивную безопасность воды и наличие благоприятных свойств для здоровья живущего и последующих поколений людей

**Гидрохимический режим** - Изменение химического состава воды водного объекта во времени

**Гиперхлорирование воды** - Хлорирование воды повышенными дозами хлора.

**Деионизация воды** - Уменьшение содержания ионов в воде.

**Денитрификация** - Уменьшение содержания в воде нитритных или нитратных ионов путем воздействия бактерий.

**Дестратификация водного объекта** - Перемешивание слоев воды в водоеме или резервуаре, приводящее к устранению стратификации.

**Дехлорирование воды** - Уменьшение содержания остаточного хлора в воде.

**Дистилляция воды** - Процесс выпаривания и конденсации, используемый для получения воды высокой степени чистоты.

**Дождевая вода** - Вода, образованная из атмосферных осадков, в которую еще не поступили растворимые вещества из поверхностного слоя земли.

**Донные отложения** - Донные наносы и твердые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно водного объекта в результате внутриводоемных физико-химических и биохимических процессов, происходящих с веществами как естественного, так и техногенного происхождения.

**Евтрофирование вод** - Повышение биологической продуктивности водных объектов в результате накопления в воде биогенных элементов

**Жесткость воды** - Свойство воды, обусловленное присутствием в ней ионов кальция и магния

**Загрязнение вод** - Поступление в водный объект загрязняющих веществ, микроорганизмов или тепла

**Загрязненность вод** - Содержание загрязняющих воду веществ, микроорганизмов и тепла, вызывающее нарушение требований к качеству воды

**Зооглейная пленка** - Клейкая биологическая пленка, содержащая бактерии рода *Zoogloea*, простейшие и грибы, покрывающая поверхности эксплуатируемых песчаных и биологических фильтров или внутренние поверхности канализационных труб.

**Зоопланктон** - Часть планктона, представленная животными.

**Индекс качества воды** - Обобщенная числовая оценка качества воды по совокупности основных показателей для конкретных видов водопользования

**Индикаторные микроорганизмы** - Условные группы микроорганизмов, присутствие которых свидетельствует о наличии антропогенного загрязнения и (или) недостаточной очистке воды.

**Ионообменный материал** - Материал, способный к осуществлению обратимого обмена ионов между собой и контактирующей водой.

**Источник загрязнения вод** - Источник, вносящий в водные объекты загрязняющие воду вещества, микроорганизмы или тепло

**Источник питьевого водоснабжения** - Водный объект (или его часть), который содержит воду, отвечающую установленным гигиеническим нормативам для источников питьевого водоснабжения, и используется или может быть использован для забора воды в системы питьевого водоснабжения.

**Качество воды** - Характеристика состава и свойств воды, определяющая пригодность ее для конкретных видов водопользования

**Кишечные вирусы** - Вирусы, способные размножаться в желудочно-кишечном тракте человека и животных, обитать или транзитно проходить через него и выделяться с фекалиями в окружающую среду. *Примечания:* 1 К представителям кишечных вирусов относится род энтеровирусов: полиовирусы, Коксаки А и В, ЕСНО, энтеровирусы 68-71. В широкую группу кишечных вирусов входят также ротавирусы, отдельные представители аденовирусов, коронавирусы, калицивирусы, реовирусы, вирусы гепатита А и Е, вирусы Норволк, астровирусы, мелкие аденоассоциированные вирусы. 2 Кишечные вирусы вызывают заболевания в различных клинических формах. Заражение осуществляется энтеральным механизмом передачи.

**Класс качества воды** - Уровень качества воды, установленный в интервале числовых значений свойств и состава воды, характеризующих ее пригодность для конкретного вида водопользования

**Коагулянт** - Вещество, стимулирующее укрупнение и осаждение взвешенных и коллоидных частиц, находящихся в воде.

**Коагуляция** - Процесс укрупнения коллоидных и взвешенных частиц.

**Колифаги** - Бактериальные вирусы, способные лизировать *E. coli* и формировать при температуре 37°C через 18-24 ч зоны лизиса на питательном агаре. *Примечание:* Благодаря сходству с кишечными вирусами человека и большой устойчивости по сравнению с индикаторными группами бактерий их рассматривают как показатели возможного вирусного загрязнения воды.

**Консервация пробы воды** - Добавление химического вещества и (или) изменение физических условий для уменьшения возможных искажений определяемых показателей в период между моментом отбора пробы воды и ее исследованием.

**Контроль качества воды** - Проверка соответствия показателей качества воды установленным нормам и требованиям

**Критерий качества воды** - Признак или комплекс признаков, по которым производится оценка качества воды

**Легионеллы** - Разновидность патогенных для человека грамотрицательных бактерий, оптимальной температурой для развития которых является 30-45°C и которые могут медленно развиваться при температуре 20°C и переносить температуру 55°C. *Примечания:* 1 Выделяются из поверхностных вод, ила, термально загрязненных озер и источников, а также распределительных систем питьевого и горячего водоснабжения. 2 Служат возбудителями пневмонии "болезни легионеров" и лихорадки Понтиака. Путь передачи инфекции - через водные аэрозоли.

**Лямблии** - Одноклеточные паразиты кишечника человека и животных, род жгутиконосцев класса зоомастигин.

**Макрофиты** - Высшие водные растения.

**Мезофильные микроорганизмы** - Микроорганизмы, которые развиваются при температуре от 20 до 45°C.

**Мембранное фильтрование воды** - Фильтрование воды через мембранный фильтр.

**Микроорганизмы** - Группа организмов, невидимых невооруженным глазом.

**Минерализация воды** - Суммарная концентрация анионов, катионов и недиссоциированных растворенных в воде неорганических веществ, выражающаяся в  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

**Минеральная вода** - Природная подземная вода, характеризующаяся постоянным ионно-солевым составом, содержанием биологически активных компонентов и специфическими свойствами. *Примечание* - Минеральные воды чаще всего обладают повышенным солесодержанием и могут обладать лечебным действием.

**Море** - Крупный естественный водоем, являющийся частью океана, обособленный сушей или возвышениями подводного рельефа и отличающийся от океана физико-географическими особенностями.

**Морская вода** - Вода, сосредоточенная в морях и океанах.

**Мутность воды** - Показатель, характеризующий уменьшение прозрачности воды в связи с наличием тонкодисперсных взвешенных частиц

**Наиболее вероятное число (НВЧ)** - Вероятностная оценка числа микроорганизмов в определенном объеме воды, полученная из сочетания положительных и отрицательных результатов в серии объемов пробы, исследованных стандартными методами с использованием жидких питательных сред.

**Насыщенность воды кислородом** - Отношение фактически установленной концентрации кислорода в воде к его равновесной концентрации в данных условиях

**Нецентрализованная система питьевого водоснабжения** - Устройства и сооружения, предназначенные для забора питьевой воды без подачи ее к местам потребления и открытые для общего пользования.

**Нормы качества воды** - Установленные значения показателей качества воды для конкретных видов водопользования

**Общее микробное число (ОМЧ)** - Общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37°C в течение 24 ч, видимые с увеличением в два раза. *Примечание:* Наряду с инкубацией при температуре 37°C используют инкубацию посевов при температуре 20-22°C в течение 72 ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.

**Общее содержание примесей в воде** - Общее количество растворенных и взвешенных веществ в воде.

**Общие колиформные бактерии; общие колиформы** - Грамотрицательные оксидазоотрицательные не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 37°C в течение 24-48 ч. *Примечание:* Индикаторная группа бактерий, указывающая на возможность фекального загрязнения воды.

**Озонирование воды** - Использование озона в процессе водоподготовки для обеззараживания воды и улучшения ее органолептических свойств

**Окраска воды** - Показатель, характеризующий наличие веществ, вызывающих окрашивание воды

**Остаточный хлор** - Хлор, остающийся в воде после хлорирования в виде свободного или связанного хлора или в обоих видах сразу.

**Паразит** - Организм, использующий в качестве источника питания или среды обитания другие организмы, нанося им в большинстве случаев вред.

**Патогенные микроорганизмы** - Микроорганизмы, способные вызывать заболевания людей, животных или растений.

**Перманганатная окисляемость** - Химическое потребление кислорода при обработке пробы воды перманганатным ионом при определенных условиях.

**Питьевая вода** - Вода, по качеству в естественном состоянии или после подготовки отвечающая гигиеническим нормативам и предназначенная для удовлетворения питьевых и бытовых потребностей человека либо для производства продукции, потребляемой человеком

**Питьевое водоснабжение** - Деятельность, направленная на обеспечение потребителей питьевой водой, включающая в себя выбор, охрану источников и сооружений водоснабжения, проектирование, строительство, эксплуатацию систем водоснабжения, забор, подготовку, хранение, подачу к местам потребления и реализацию питьевой воды.

**Планктон** - Сообщество организмов, состоящее из растений и животных, взвешенных в толще воды и дрейфующих с ее потоками.

**Подземная вода** - Вода, в том числе минеральная, находящаяся в подземных водных объектах.

**Порог восприятия запаха воды** - Минимальный уровень запаха воды, различимый ольфакторными органами (воспринимаемый обонянием) человека. *Примечания:* 1 Абсолютного значения порога восприятия запахов не существует из-за врожденной разницы ольфакторной чувствительности у разных людей. 2 Значение порога восприятия запаха воды определяют серийным разведением пробы воды чистой водой без запаха до тех пор, пока запах не станет неразличим.

**Предельно допустимая концентрация веществ в воде (ПДК)** - Концентрация веществ в воде, выше которой вода непригодна для одного или нескольких ви-



дов водопользования

**Пресные воды** - Воды с минерализацией до  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

**Проба воды** - Определенный объем воды, отобранный для исследования ее состава и свойств.

**Пробоотборник** - Устройство, используемое для отбора проб воды.

**Прогнозирование качества воды** - Определение качества воды на перспективу с учетом действующих и планируемых факторов воздействия на водный объект

**Прозрачность воды** - Показатель, характеризующий способность воды пропускать световые лучи

**Психрофильные микроорганизмы** - Микроорганизмы, которые развиваются при температуре менее  $20^\circ\text{C}$ .

**Радиоактивность воды** - Показатель, характеризующий содержание в воде радиоактивных веществ

**Рассолы** - Воды с минерализацией свыше  $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

**Регулирование качества воды** - Воздействие на факторы, влияющие на состояние водного объекта, с целью соблюдения норм качества воды

**Род Псевдомонады** - Аэробные грамотрицательные оксидазоположительные каталазположительные бактерии, не образующие спор, повсеместно распространенные в водной среде. *Примечания:* 1 Используют для своего роста простые органические и неорганические соединения, вследствие чего хорошо размножаются при попадании в питьевую воду, не содержащую хлора (или других обеззараживающих агентов), в частности в воде, расфасованной в емкости. 2 Широко распространенным видом псевдомонад, длительно выживающим в водной среде, является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) - условно-патогенный микроорганизм, способный вызывать раневые и кишечные инфекции.

**Родник** - Естественный сосредоточенный выход подземной воды на поверхность земли.

**Ручей** - Небольшой водоток, образованный снеговыми, дождевыми водами, а также выходящими на поверхность подземными водами.

**Рыбохозяйственный критерий качества воды** - Критерий качества воды, учитывающий пригодность ее для обитания и развития промысловых рыб и промысловых водных организмов

**Сальмонеллы** - Род бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. *Примечание:* Патогенные бактерии, способные вызывать кишечные инфекции, в том числе брюшной тиф, паратифы.

**Самоочищение вод** - Совокупность природных процессов, направленных на восстановление экологического благополучия водного объекта

**Санитарно-показательные микроорганизмы** - Индикаторные микроорганизмы, свидетельствующие о возможном фекальном загрязнении и потенциальной опасности присутствия в воде возбудителей инфекционных заболеваний.

**Сапробность** - Способность водных организмов обитать в воде, содержащей различное количество органических веществ

**Свободный хлор** - Хлор, присутствующий в воде в виде хлорноватистой кислоты или (и) гипохлорит-иона.

**Связанный хлор** - Хлор, присутствующий в воде в виде хлораминов.

**Седиментация** - Осаждение и отложение в воде взвешенного вещества под действием силы тяжести.

**Сеть пунктов отбора проб воды** - Совокупность заранее определенных точек отбора проб.

**Содержание нефтепродуктов в воде** - Экстрагируемые из воды неполярные и малополярные углеводороды. *Примечание:* В международной практике используют термин "углеводородный индекс".

**Соленые воды** - Воды с минерализацией от 10 до 50 g·dm<sup>-3</sup>

**Солоноватые воды** - Воды с минерализацией от 1 до 10 g·dm<sup>-3</sup>

**Составная проба воды** - Две или более проб воды или их частей, смешиваемых в заданных пропорциях.

**Стратификация водного объекта** - Наличие внутри водной массы слоев, характеризующихся разной плотностью, температурой, солесодержанием, а также разным содержанием кислорода или биогенных элементов.

**Сульфитредуцирующие клостридии** - Спорообразующие анаэробные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфиты до сульфидов. *Примечания:* 1 Широко распространены в почве, поверхностных и сточных водах, часто встречаются в фекалиях. 2 Споры сульфитредуцирующих клостридий, являясь более устойчивыми по сравнению с вегетативными формами бактерий к воздействию неблагоприятных физических и химических факторов, используются как индикатор качества обработки при водоподготовке питьевой воды.

**Термотолерантные колиформные бактерии; термотолерантные колиформы** - Бактерии, обладающие признаками общих колиформных бактерий, а также способные ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 44°C в течение 24 ч. *Примечание:* Индикаторная группа бактерий, указывающая на фекальное загрязнение воды.

**Термофильные микроорганизмы** - Микроорганизмы, которые развиваются при температуре более 45°C.

**Токсобность** - Способность организмов обитать в воде, содержащей различное количество токсичных веществ

**Точечная проба воды** - Проба воды, получаемая однократным отбором необходимого объема воды в точке отбора проб.

**Точка отбора пробы воды** - Зафиксированное местоположение отбора пробы воды.

**Трофность водного объекта** - Характеристика продукционных свойств водного объекта. *Примечание.* В порядке увеличения продукционных свойств выделяют три типа водных объектов: олиго-, мезо- и эвтрофные.

**Удельная электропроводность воды** - Электропроводность единицы объема воды.

**Условно-патогенные микроорганизмы** - Микроорганизмы, которые в обычных условиях обитания в организме человека или животных не вызывают инфекционного процесса, но могут стать причиной заболевания.

**Факультативные анаэробы** - Организмы, обычно аэробные, но выживающие или размножающиеся в отсутствие кислорода.

**Факультативные аэробы** - Организмы, обычно анаэробные, но выживающие и слабо размножающиеся в присутствии кислорода.

**Фекальные стрептококки** - Грамположительные каталаз-отрицательные полиморфные кокки, располагающиеся попарно или в цепочках, способные расти на питательных средах с азидом натрия. *Примечания:* 1 Индикаторная группа фекальных стрептококков включает в себя виды энтерококков, имеющих антиген группы Д. 2 Обнаружение фекальных стрептококков в воде, даже в отсутствие *E. coli*, указывает на фекальное загрязнение воды.

**Фенольный индекс** - Массовая концентрация фенолов в воде, вступающих в реакцию с 4-аминоантипирином и в определенных условиях образующих с ним окрашенные соединения.

**Фильтрация воды** - Отделение примесей, частей или микроорганизмов от воды через слой пористого материала или сетку.

**Фитопланктон** - Часть планктона, представленная растениями.

**Флокулянт** - Вещество, вызывающее интенсивное образование рыхлых хлопьевидных агрегатов в результате агломерации находящихся в воде мелких взвешенных частиц.

**Флокуляция** - Агломерация с применением флокулянта.

**Флотация** - Процесс отделения диспергированных и коллоидных примесей от воды, основанный на способности частиц прилипать к воздушным или газовым пузырькам и переходить вместе с ними в пенный слой.

**Фотоавтотрофные бактерии** - Бактерии, использующие для метаболизма энергию света и диоксид углерода.

**Химический состав воды** - Совокупность находящихся в воде веществ в различных химических и физических состояниях

**Химическое потребление кислорода (ХПК)** - Количество кислорода, потребляемое при химическом окислении содержащихся в воде органических и неорганических веществ под действием различных окислителей

**Хлорирование воды** - Обеззараживание воды путем добавления в воду хлора или его соединений, образующих хлорноватистую кислоту или гипохлорит-ионы.

**Цветность воды** - Показатель, характеризующий интенсивность окраски воды

**Централизованная система питьевого водоснабжения** - Комплекс устройств, сооружений и трубопроводов, предназначенных для забора, подготовки или без нее, хранения, подачи к местам потребления питьевой воды и открытый для общего пользования.

**Цисты лямблий** - Временная форма существования лямблий, обеспечивающая их выживание во внешней среде, переход от одного организма-хозяина к другому.

**Экологический критерий качества воды** - Критерий качества воды, учитывающий условия нормального во времени функционирования водной экологической системы

**Экономический критерий качества воды** - Критерий качества воды, учитывающий рентабельность использования воды водного объекта

***Escherichia coli*; E. coli** - Аэробные и факультативно-анаэробные термоустойчивые колиформные бактерии, которые ферментируют лактозу или маннит при температуре 44°C в течение 24 ч с образованием кислоты и газа, а также производят индол из триптофана. *Примечание:* Индикаторная группа бактерий, включающая в себя преимущественно *E. coli* и указывающая на фекальное загрязнение воды.

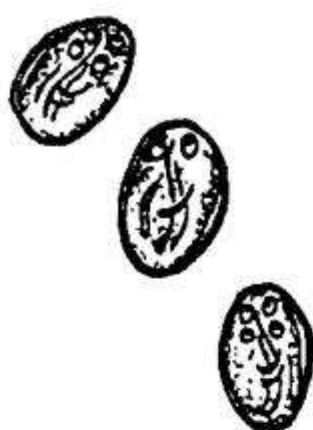
## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Расчет наиболее вероятного числа бактерий в 100 мл воды незагрязненных водоемов (тема 2.4)

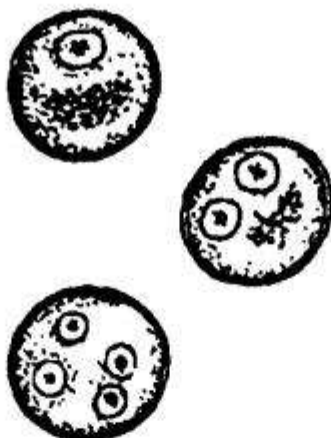
Число положительных результатов из			НВЧ бактерий в 100 мл
одного объема по 50 мл	пяти объемов по 10 мл	пяти объемов по 1 мл	
1	2	3	4
1	2	3	4
0	0	0	менее 1
0	0	1	1
0	0	2	2
0	1	0	1
0	1	1	2
0	1	2	3
0	2	0	2
0	2	1	3
0	2	2	4
0	3	0	3
0	3	1	5
0	4	0	5
1	0	0	1
1	0	1	3
1	0	2	4
1	0	3	6
1	2	3	4
1	1	0	3
1	1	1	5
1	1	2	7
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	1	35
1	5	2	54
1	5	3	92
1	5	4	160
1	5	5	более 240

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

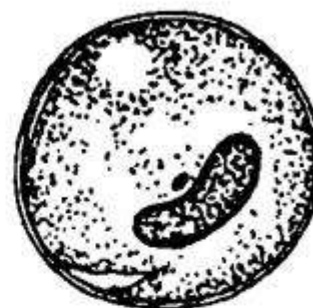
Цисты патогенные кишечных простейших и яйца гельминтов, определяемые методикой санитарно-паразитологического исследования воды (тема 3.2)



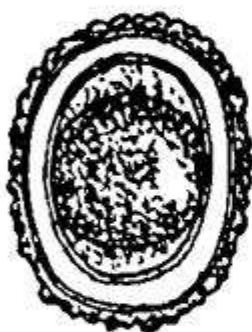
Цисты  
лямблий



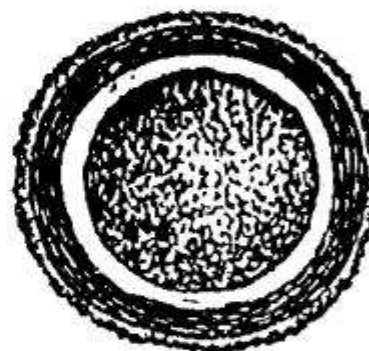
Цисты амебы  
дизентерийной



Цисты балантидия  
кишечного



Яйца аскариды человеческой (свиной),  
слева – оплодотворенное яйцо,  
справа – инвазионное



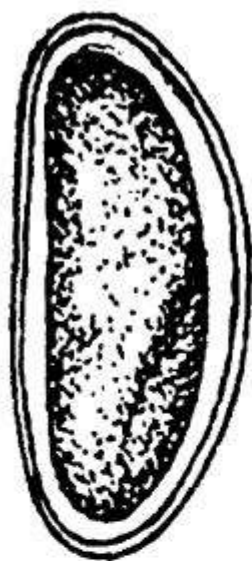
Яйца власоглава,  
слева – свежвыделенное,  
справа – инвазионное



Яйца аскариды собачьей (токсокары),  
вверху – яйцо на начальной стадии развития,  
внизу – инвазионное

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

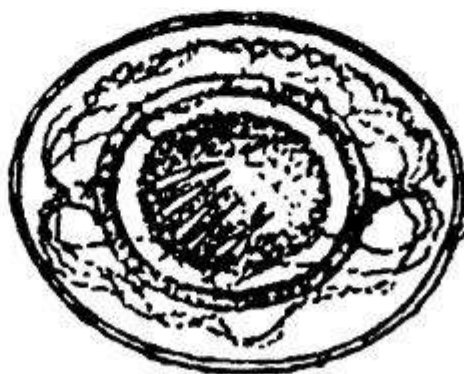
Яйца гельминтов, определяемые методикой санитарно-паразитологического исследования воды (тема 3.2)



Яйцо острицы



Онкосфера тенид

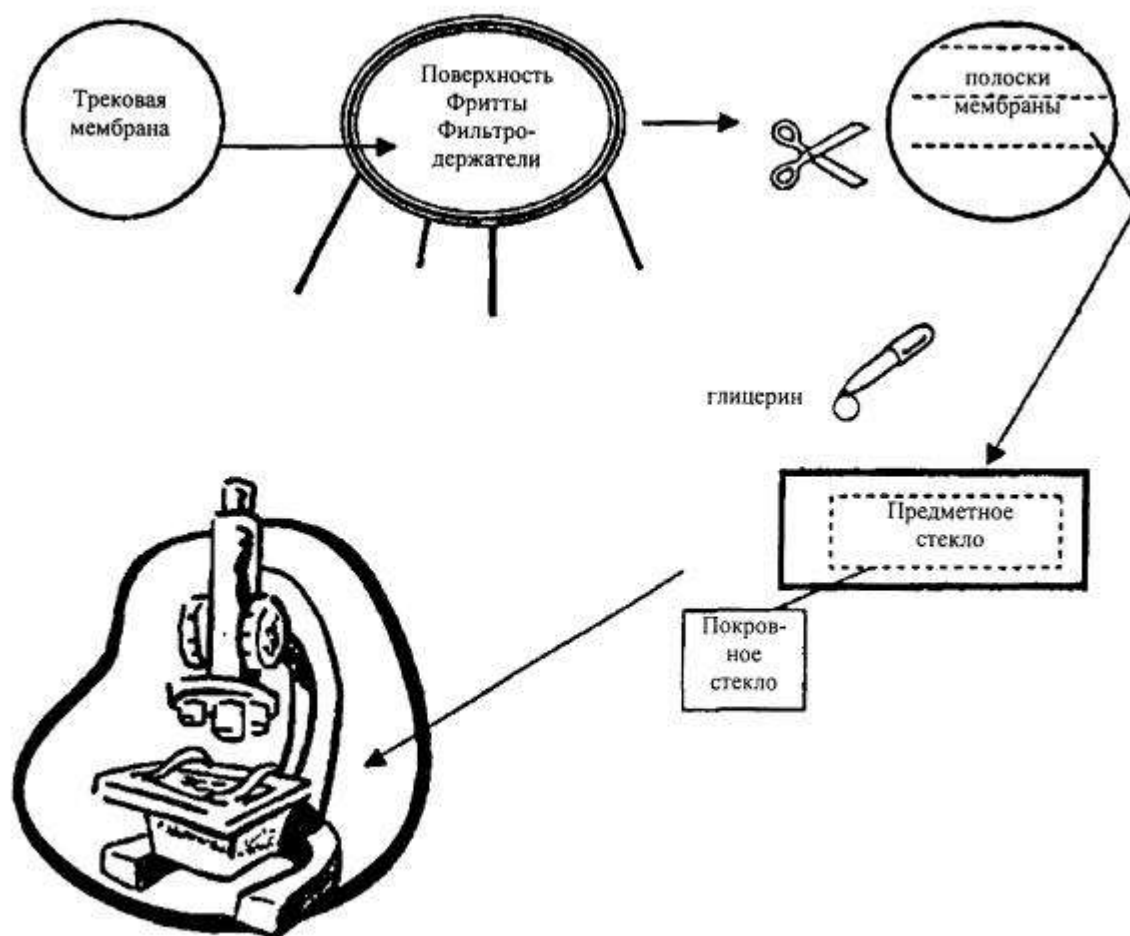


Яйцо цепня карликового

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Схема выполнения методики использования прозрачных аналитических трековых мембран (тема 3.2)

Фильтровальный прибор



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

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вода и водоподготовка. Термины и определения [Текст] : ГОСТ 30813-2002. – Введ. 2004-01-01. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2002 – 16 с.
2. Вода питьевая. Методы определения вкуса, запаха, цветности и мутности [Текст] : ГОСТ 3351-74. – Введ. 1975-01-07. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2003. – 8 с.
3. Вода питьевая. Отбор проб [Текст] : ГОСТ Р 51593-2000. – Введ. 2001.01.01. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2001. – 8 с.
4. Вода. Общие требования к отбору проб [Текст] : ГОСТ Р 51592-2000. – Введ. 2001-07-01. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2000 – 30 с.
5. Вода. Отбор проб для микробиологического анализа [Текст] : ГОСТ Р 53415-2009 (ИСО 19458:2006). – Введ. 2011-07-01. – М. : Стандартинформ, 2010. – 16с.
6. Волкова, И. В. Оценка качества воды водоёмов рыбохозяйственного назначения с помощью гидробионтов / И. В. Волкова, Т. С. Ершова, С. В. Шипулин. – М. : Колос, 2009. – 352с.
7. Гигиенические требования к охране поверхностных вод [Текст] : СанПиН 2.1.5.980-00. – Москва, 2000. – Введ. 2001-01-01. – Актуализация 2008-10-01.
8. Дементьев, Е. П. Методические указания к лабораторным работам по разделу «Санитарно-гигиенические исследования воды» / Е. П. Дементьев, Е. В. Цепелева. – Уфа : Башкирский ГАУ, 2013. – 28 с.
9. Качество воды. Отбор проб. Руководство по составлению программ отбора проб : ИСО 5667-1-1980.
10. Константинов, А. С. Общая гидробиология / А. С. Константинов. – М. : Высшая школа, 1986. – 472с.
11. Кузнецов, С. И. Методы изучения водных микроорганизмов / С. И. Кузнецов, Г. А. Дубинина. – М. : Наука, 1989. – 288с.
12. Кузьмина, И. А. Малый практикум по гидробиологии / И. А. Кузьмина. – М. : Колос, 2007. – 232с.
13. Маннапова, Р. Т. Микробиология и иммунология. Практикум : учебное пособие / Р. Т. Маннапова. – М : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 544с. : ил.
14. Новикова, О. В. Санитария и гигиена в рыбоводстве / О. В. Новикова. – М. : Агропромиздат, 1991. – 91 с.
15. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды [Текст] : Методические указания, МУК 4.2.1018-01.- Минздрав России, Москва, 2001.
16. Санитарно-микробиологический и санитарно - паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов [Текст] : Методические указания, МУК 4.2.1884-04. – Введ. 2004-03-03.
17. Санитарно-паразитологическое исследование воды [Текст] : Методические указания, МУК 4.1.668-97 Утверждены Минздравом России. – М. 1999.



## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>Раздел 1 ОБЩАЯ САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ</b>	5
1.1 Предмет, задачи и история развития санитарной гидробиологии	5
1.2 Показатели качества воды	8
1.3 Самоочищение водоемов	14
1.4 Источники загрязнения водоемов	16
1.5 Сапробность водоемов	22
1.6 Организация системы наблюдений и контроля над загрязнением водоемов	25
1.7 Оборудование для отбора проб воды и ила. Типы и методы	30
1.8 Подготовка посуды для отбора проб	42
1.9 Отбор проб воды для микробиологического анализа	46
1.10 Микроскопические методы исследований живых объектов	56
1.11 Электронно-микроскопические исследования микроорганизмов	61
1.12 Основные методы окраски бактерий	65
1.13 Органолептический метод определения запаха, вкуса и привкуса питьевой воды	73
1.14 Определение цветности воды	75
1.15 Определение мутности и прозрачности воды	79
1.16 Определение пенистости воды	81
1.17 Определение температуры воды	82
<b>Раздел 2 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ</b>	84
2.1 Определение общего числа микроорганизмов в воде	84
2.2 Определение спор сульфитредуцирующих клостридий	86
2.3 Определение числа стафилококков	88
2.4 Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом	89
2.5 Определение колифагов	93
2.6 Определение сальмонелл	97
<b>Раздел 3 САНИТАРНО-ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ</b>	99
3.1 Санитарно-паразитологические методы исследования воды поверхностных водоемов	99
3.2 Санитарно-паразитологическое исследование воды на наличие цист лямблий, яйца и личинки гельминтов, ооцист криптоспоридий	103
<b>ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ОБЛАСТИ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ</b>	108
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>	116
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК</b>	120

Учебное издание

Ильясова Зулейха Закуановна

САНИТАРНАЯ ГИДРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Ответственный редактор А. В. Андреева

ФГБОУ ВПО «Башкирский ГАУ»  
450001 г. Уфа ул. 50-летия Октября, 34