

EXAMENUL MICROBIOLOGIC SANITAR AL APEI

57.1. DATE GENERALE: CADRUL PROBLEMEI ȘI INDICAȚII

Flora microbiană a apelor naturale depinde în mare măsură de originea lor. Se deosebesc:

- a) ape superficiale (dulci), care cuprind apele curgătoare din râuri, pârâuri și apele stătătoare din lacuri, iazuri, diverse rezervoare;
- b) ape subterane din izvoare, fântâni arteziene;
- c) ape atmosferice provenite din zăpadă, ploaie;
- d) ape de mare.

Din punctul de vedere al utilizării distingem:

- a) apa potabilă și menajeră din sisteme centralizate de aprovizionare și necentralizate (fântâni, izvoare, arteziene);
- b) apa bazinelor de înot;
- c) gheața medicinală și menajeră;
- d) apele reziduale (fecaloid-menajere, industriale, mixte).

Analiza bacteriologică sanitară a apei se efectuează pentru controlul curent al calității apei potabile furnizată de instalații centrale sau din surse locale la toate etapele aprovizionării începând de la locul captării, la instalațiile de epurare, în diferite puncte din rețeaua de distribuție, până la robinetele apeductului intern.

Apa bazinelor de înot se examinează în mod planificat (controlul curent) și la indicații epidemiologice. Apa din bazinele de înot trebuie să corespundă cerințelor apei de robinet.

Analiza *apelor de suprafață* se face pentru aprecierea posibilității folosirii rezervorului de apă ca sursă de aprovizionare cu apă potabilă și menajeră sau în scopuri recreative, uneori în scopul determinării sursei de poluare fecală și pentru aprecierea capacității de autoepurare.

Scopul examenului bacteriologic sanitar al *apelor reziduale* este de a controla eficiența epurării și dezinfecției lor și a sedimentului. Se verifică corectitudinea exploatării instalațiilor de epurare, ceea ce permite depistarea din timp a pătrunderii microorganismelor patogene în rezervor o dată cu apele reziduale.

În concluzie, examenul bacteriologic sanitar al apei se efectuează pentru:

- selectarea surselor de alimentare centrală cu apă potabilă și menajeră;
- controlul periodic al eficienței dezinfecției apei potabile furnizată de instalații centrale;
- determinarea calității apei utilizate din surse locale;

- controlul stării sanitaro-epidemiologice a apelor bazinelor deschise (lacuri, iazuri, fluvii);

- controlul eficienței dezinfecției apei din bazinele de înot;

- controlul calității epurării apelor reziduale;

- investigarea izbucnirilor hidrice de boli infecțioase.

Realizarea acestor scopuri este prevăzută în următoarele documente normative: STAS 2761-84 «Sursele de alimentare centrală cu apă potabilă și menajeră»; STAS 2874-82 «Apa potabilă. Cerințele igienice și controlul calității»; STAS 18963-73 «Apa potabilă. Metodele analizei sanitaro-bacteriologice»; Indicațiile metodice 2285-81 «Cu privire la analiza sanitaro-microbiologică a bazinelor deschise».

Încadrarea apelor în prevederile standardelor de stat se efectuează după următorii indicatori microbiologici:

- titrul și indicele coliformilor, coliformilor fecali, enterococilor, stafilococilor;

- numărul total de microorganisme.

La indicații epidemiologice se determină prezența microorganismelor patogene (salmonele, shigele, leptospire, vibriionul holeric ș.a.).

57.2. EFECTUAREA ANALIZEI

57.2.1. Recoltarea, conservarea și transportul probelor de apă

Probele de apă se recoltează în flacoane sterile prevăzute cu dopuri de sticlă sau de vată în tifon și capac de hârtie legat cu sfoară în jurul gâtului.

Apa de conductă se recoltează în volum de 500 ml direct la robinet. În prealabil se frambează robinetul cu un tampon de vată îmbibat cu alcool, apoi se deschide complet și se așteaptă să curgă apa 10 minute. Se scoate dopul și se menține flaconul sub coloana de apă pentru a-l umple până la cca 1 cm sub dop. Apa clorinată se recoltează în flacoane cu declorator: 10 mg hiposulfid de sodiu pentru 500 ml apă. Se astupă flaconul cu dopul, se fixează cu sfoară capacul de hârtie și se etichetează. În documentul însoțitor se indică: locul, data (ziua, luna, anul) și ora recoltării, analizele solicitate și numele persoanei care a recoltat proba.

Din *izvoare* se recoltează proba direct din curentul de apă sau din mijlocul izvorului, la adâncime de 10—15 cm de la suprafață. De la aceeași adâncime se recoltează și apa din *fântâni* sau din *fântâni arteziene*.

Din *bazinele deschise* se recoltează o serie de probe la distanțe diferite de mal și la diferite adâncimi cu ajutorul unor *batometre*, care sunt flacoane cu suport metalic. În acest caz, în documentul de însoțire se indică distanța de la mal, adâncimea, distanța surselor de poluare, viteza scurgerii, temperatura apei și aerului.

Volumul *apelor reziduale* recoltat pentru analiză este diferit în funcție de scopul analizei și locul recoltării (la etapele de epurare, după dezinfectare, la locul scurgerii) și variază de la 10 la 500 ml.

Gheața se recoltează în bucăți de 2 kg, iar în laborator se spală cu apă sterilă și, din profunzime, se taie cu instrumente sterile câteva bucăți cu masa totală de 500 g, care se introduc în vas steril, se mențin la temperatura camerei până la topire, apoi se examinează.

Pentru *depistarea microorganismelor patogene*, în funcție de gradul prezumptiv de

impurificare, se recoltează 3 litri de apă de robinet, 1 litru apă din bazinele deschise, 50—100 ml ape reziduale.

Probele de apă se transportă în truse frigorifice sau în lăzi termoizolate în care se menține temperatura de 1—2°C. Analiza apei trebuie făcută în cel mult 2 ore din momentul recoltării. Temporizarea examenului până la 6 ore se admite excepțional dacă se păstrează proba la +4°C. Probele primite în laborator se înregistrează în registre speciale.

57.2.2. Determinarea numărului total de microorganisme (NTM)

Numărul total de microorganisme include germenii mezofili saprofiți, facultativ anaerobi, care populează rezervorul de apă și sunt capabili să formeze, pe mediile de cultură, colonii vizibile cu ochiul liber sau cu lupa la mărire de 2—5X.

Când se examinează apa curată, se pipetează aseptice câte 1 ml, din probele nediluate, în două cutii Petri sterile, în care se toarnă imediat câte 5—7 ml geloză nutritivă topită și răcită la 45°C. Se omogenizează conținutul cutiilor și se repartizează uniform prin mișcări ușoare de rotație, fără a ridica cutia de pe suprafața mesei. După solidificarea gelozei, cutiile se introduc în termostat, cu capacul în jos, pentru incubare.

Dacă se examinează apă mai impurificată (din rezervoare deschise, ape reziduale), se pregătesc diluții decimale succesive: se pipetează 1 ml apă nediluată într-o eprubetă cu 9 ml apă de robinet sterilă, se omogenizează amestecul și se obține diluția 10⁻¹; 1 ml din această diluție se transferă în altă eprubetă cu 9 ml apă sterilă, pentru a obține diluția 10⁻² etc. Pentru fiecare diluție se utilizează o pipetă aparte. În funcție de gradul impurificării se pregătesc diluții de la 10⁻¹ la 10⁻⁶. Din fiecare diluție, folosind pipete noi, sterile, se însămânțează câte 1 ml în 2 cutii Petri sterile și se toarnă geloză nutritivă ca și la analiza apei nediluate.

Când se examinează apa furnizată de instalațiile centrale sau din surse de aprovizionare cu apă potabilă și menajeră, din zonele de recreație, bazinele de înot, se determină numărul de microorganisme saprofite capabile să se dezvolte la 37°C în 24 ore. Dar când se selectează o sursă nouă de aprovizionare cu apă, trebuie să determinăm două grupe de microorganisme: numărul microorganismelor saprofite care se dezvoltă la 20—22°C în 48 ore și numărul celor care cresc la 37°C în 24 ore. Deci trebuie să însămânțăm cu fiecare diluție 2 seturi de câte 2 plăci.

La temperatura de 20—22°C crește un număr considerabil mai mare de microbi mai activi în procesul de autoepurare a rezervorului de apă. În cazul unei poluări cu ape reziduale ambele grupe de microorganisme apar în cantități apropiate și de aceea dinamica numerică a acestui indice este considerată ca un indicator sensibil al poluării rezervorului de apă cu substanțe organice.

După incubare se numără toate coloniile crescute atât la suprafața, cât și în profunzimea gelozei. Pentru numărare se aleg plăcile însămânțate cu diluțiile din care au crescut între 40 și 300 de colonii, procedeu care minimizează eroarea. Numărarea se face pe fundul cutiei, marcând cu creionul fiecare colonie. Dacă nu ne putem încadra în această condiție și pe plăci au crescut mai mult de 300 colonii, recurgem la dispozitive speciale de numărare: o placă de sticlă împărțită în pătrate cu latura de 1 cm. Se numără coloniile din 10 pătrate în diferite sectoare ale plăcii și se determină numărul mediu de colonii într-un pătrat. Numărul total de colonii reiese din formula:

$$X = S \cdot \pi R^2,$$

unde:

X — numărul de colonii pe toată suprafața plăcii;

S — numărul de colonii per pătrat;

$\pi = 3,14$;

R — raza plăcii.

E.g., dacă S este egal cu 10 și raza cu 5 cm, atunci numărul de colonii crescute pe suprafața plăcii este $10 \times 3,14 \times 25 = 785$.

Numărătoarea coloniilor se simplifică, dacă folosim dispozitive cu contor automat: la contactul electrostiloului cu suprafața plăcii, unde este colonia, impulsul se transmite la contorul care înregistrează colonia, iar pe ecranul contorului apare cifra însumată a coloniilor.

Numărul total al bacteriilor/ml probă se calculează ca produs al numărului mediu de colonii per placă cu inversul diluției înșămânțate.

57.2.3. Determinarea coliformilor

Aceste bacterii pătrund în mediul ambiant, inclusiv în apă, cu materiile fecale ale omului și animalelor, din care cauză prezența lor indică o impurificare fecală. Numărul coliformilor în apă caracterizează gradul de poluare și, respectiv, pericolul epidemiologic de infecții intestinale.

Determinarea coliformilor se efectuează prin două metode: metoda membranelor filtrante și metoda titrării (fermentării).

57.2.3.1. Metoda membranelor filtrante

Prin această metodă se determină *indicele coli*: cantitatea de bacterii coliforme într-un litru de apă. Metoda este precisă, accesibilă și economică. Se bazează pe capacitatea membranelor filtrante de a reține pe suprafață bacteriile din apa examinată cu cultivare ulterioară pe medii diferențiale și identificarea lor.

Întrebuițăm membrane filtrante din nitroceluloză N2 și N3. În prealabil membranele, examinate macroscopic pentru a le exclude pe cele cu orificii sau fisuri, se fierb 10 minute în apă distilată. Fierberea se repetă de 3—5 ori cu schimbarea apei, pentru a înlătura resturile de solvenți utilizați la fabricarea lor. Se păstrează membranele uscate în apă distilată, iar în ziua analizei se mai fierb o dată timp de 10 minute. Filtrarea se efectuează cu dispozitivul filtrant Seitz sterilizat prin flambare cu un tampon de vată imbibat cu alcool etilic. Cu o pensă sterilă se montează membrana filtrantă pe o rețea metalică, apoi se fixează pâlția cu șuruburile de ajustare. Se acționează sistemul de vacuum (pompa de vid, trompă de apă) și se filtrează un volum de apă calculat în așa mod ca pe membrana filtrantă să crească cel mult 30 de colonii izolate. E.g se filtrează un volum de 333 ml de apă furnizată din instalații centrale sau 100 ml de apă din surse necentralizate ori din bazinele de înot. O probă se filtrează fracționat prin 2—3 membrane. Fiecare membrană, scoasă cu pensă sterilă, se aplică, cu suprafața pe care s-au fixat bacteriile în sus, pe o placă cu mediul Endo. Pe aceeași placă se pot aplica 3—4 membrane. După ce se marchează volumul filtrat prin fiecare membrană, numărul probei și data, se incubează plăcile 24 ore la 37°C. Dacă în volumul de apă filtrată sunt prezenți coliformi, pe suprafața membranelor filtrante cresc colonii tipice pentru bacterii coli: roșii-închis cu luciu metalic sau roz cu centrul roșu. Din colonii se efectuează frotiuri, care se colorează Gram și se examinează microscopic. Prin testul oxidazei se diferențiază coloniile de *Enterobacteriaceae* (oxidazonegative) de cele de *Pseudomonadaceae* (oxidazopozitive). Pentru aceasta se transferă, cu pensă sterilă, membrana filtrantă cu colonii pe o hârtie de filtru imbibată

cu reactivul α -naftoldimetilparafenilendiamină. Coloniile de coliformi sunt oxidazonegative (nu își modifică culoarea roșie) și semnifică o poluare fecală a apei. Coloniile care în interval de 2—5 minute devin albastre sunt oxidazopozitive și nu se iau în considerație.

În cazuri nesigure (colonii roz sau incolore, dar oxidazonegative) se studiază suplimentar capacitatea de fermentare a glucozei la 37°C cu formare de acid și gaz.

Pentru determinarea indicelui coli, numărul de colonii tipice pentru coliformi se înmulțește cu 1000 și se împarte la volumul de apă filtrată. E. g., se filtrează 300 ml apă prin 2 membrane pe care au crescut 2 și, respectiv, 4 colonii. Indicele coli va fi egal cu $(6 \times 1000) : 300 = 20$.

Titrul coli, cantitatea minimă de apă care conține o bacterie coliformă, se calculează împărțind 1000 la valoarea indicelui coli. Continuând exemplul de mai sus: $1000 : 2 = 50$ ml.

Conform cerințelor STAS, indicele coli maxim admis pentru apa potabilă este 3, iar pentru bazinele de înot 10.

57.2.3.2. Metoda titrării

Această metodă constă în determinarea titrului coli și a indicelui coli prin însămânșarea anumitor volume de apă în medii de îmbogățire incubate la 37°C cu repicare ulterioară pe mediul Endo și identificarea culturilor izolate. Ca mediu de îmbogățire servește bulionul peptonat cu glucoză/lactoză, indicator de pH și tuburi Durham pentru indicarea gazului. Volumele de apă însămânșate diferă în funcție de gradul impurificării. Astfel din probele prelevate:

- la intrarea în rețeaua de aprovizionare centrală și de la robinet se însămânșează câte 3 volume de 100 ml, 3 volume de 10 ml și 3 volume de 1 ml;
- la etapele de epurare și dezinfectare se însămânșează 100; 10; 1 și 0,1 ml;
- din apa bazinelor de suprafață se însămânșează 10; 1; 0,1 și 0,01 ml;
- din apele reziduale până la epurare se însămânșează câte 1 ml din fiecare diluție decimată de la 10^{-3} până la 10^{-6} , iar după epurare 1 și 0,1 ml din proba ca atare și câte 1 ml din diluțiile 10^{-2} și 10^{-3} . Volumele de 100 și 10 ml se însămânșează în flacoane cu mediu dublu concentrat, iar volumele de 1 și 0,1 ml în eprubete cu mediul normal concentrat. Recipientele însămânșate se incubează 24 ore la 37°C.

În etapa a doua, din eprubetele cu turbiditate, acid și gaz, se efectuează repicări în sectoare pe plăci cu mediul Endo, care, de asemenea, se incubează 24 ore la 37°C. Coloniile cu aspecte tipice pentru coliformi se controlează prin proba oxidazei. Prezența bacililor gramnegativi și oxidazonegativi permite formularea unui răspuns pozitiv. Apartenența la grupul coliformilor a coloniilor atipice (roz, incolore) se apreciază prin confirmarea că sunt bacili gramnegativi, care nu produc oxidază, dar degradează glucoza cu acid și gaz la 37°C. Rezultatele le exprimăm prin indicele coli și titrul coli, consultând tabelele speciale (tabelul 57.1 și 57.2).

Din grupul coliformilor se diferențiază *coliformii fecali*: bacili gramnegativi, nesporulați, care nu produc oxidază și degradează lactoza cu producere de acid și gaz după 24 ore la 37°C. Numărul coliformilor fecali indică gradul poluării fecale a apei și demonstrează, indirect, pericolul epidemiologic în ce privește agenții patogeni ai infecțiilor intestinale.

Escherichia coli este un indicator suplimentar, care demonstrează o poluare fecală recentă. Se izolează în bulion biliat cu lactoză și acid boric sau bulion biliat cu verde briliant și lactoză. Drept *E. coli* considerăm bacteriile lactozopozitive, care degradează lactoza cu formare de acid și gaz la temperatura de $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ în prezența inhibitorilor florei de asociație și produc indol la aceeași temperatură.

Tabelul 57.1. Determinarea coliformilor per litru de apă potabilă furnizată centralizat

Numărul rezultatelor pozitive din 3 volume, ml			Indicele coli	Titrul coli
100	10	1		
0	0	0	<3	>333
0	0	1	3	333
0	1	0	3	333
1	0	0	4	250
1	0	1	7	143
1	1	0	7	143
1	1	1	11	91
1	2	0	11	91
2	0	0	9	111
2	0	1	14	72
2	1	0	15	67
2	1	1	20	50
2	2	0	21	48
2	2	1	28	86
3	0	0	23	43
3	0	1	39	26

Tabelul 57.2. Determinarea coliformilor per litru de apă la etapele de epurare

Volumul de apă examinată, ml				Indicele coli	Titrul coli
100	10	1	0,1		
—	—	—	—	<9	>111
—	—	+	—	9	111
—	+	—	—	10	105
+	—	—	—	23	43
+	—	+	—	94	10
+	+	—	—	230	4
+	+	—	+	960	1
+	+	+	—	2380	0,4
+	+	+	+	>2380	<0,4

57.2.4. Determinarea enterococilor

Enterococii sunt considerați ca un indicator microbiologic al unei impurificări fecale recente. Ei pătrund în mediul ambiant cu fecalele omului, animalelor sau păsărilor și sunt

mai rezistenți, în comparație cu coliformii, la acțiunea temperaturii și substanțelor dezinfectante. Sunt un indicator prețios în analiza apei bazinelor de înot. Dacă indicele enterococilor depășește 500, se presupune o poluare fecală recentă și rezervorul de apă este considerat nefavorabil din punct de vedere epidemiologic.

Depistarea enterococilor se efectuează prin metoda membranelor filtrante sau, în cazul unei impurificări masive, a titrării.

57.2.4.1. Metoda membranelor filtrante

Volumul de apă care trebuie filtrat se stabilește în raport cu gradul prezumtiv de impurificare. După filtrare, uzuală, se transferă membranele filtrante pe o placă cu mediu Slanetz-Bartley (geloză cu extract de levură, glucoză, azid de sodiu, clorură de trifenil-tetrazoliu), care este incubată 24 ore la 37°C. Pe acest mediu enterococii formează colonii mici, bombate, rotunde, de culoare vișinie-închis. Identificarea se face pe baza caracterelor morfotinctoriale și prin testarea catalazei. Pentru determinarea catalazei se depune pe suprafața coloniei o picătură din soluția 3% de peroxid de hidrogen. Apariția bulelor indică producerea de către bacterii a catalazei și asemenea colonii nu se iau în considerație. Enterococii sunt catalazonegativi. Indicele enterococilor se calculează după formula:

$$\frac{\text{număr colonii de enterococi}}{\text{volum de apă filtrat}} \times 1000$$

57.2.4.2. Metoda de titrare

Se însămânțează diferite volume de apă în mediul de îmbogățire cu repicare ulterioară pe mediu solid selectiv, pentru a obține colonii izolate, care se identifică și se determină indicele.

Se însămânțează volume de 100 și 10 ml apă, în 100 ml și, respectiv, 10 ml mediu de îmbogățire dublu concentrat (bulion peptonat alcalin cu glucoză, extract de levură, polimixină, albastru de bromtimol), iar volumele de 1 ml ale diluțiilor se însămânțează în 5 ml de mediu cu concentrație obișnuită. Se incubează probele însămânțate 24 ore la 37°C. În etapa a doua se repică toate probele pozitive (turbiditate, virajul culorii în galben) în sectoare pe plăci Petri cu mediu selectiv (geloză cu lapte, cristal violet și telurit de potasiu).

După 24 ore de incubare la 37°C, se verifică microscopic, pe frotiu colorat Gram, coloniile negre, bombate, cu luciu metalic și se stabilește indicele enterococilor consultând tabelele standard.

57.2.5. Determinarea stafilococilor

Acest indicator microbiologic este necesar la analiza apei în zonele de recreație și bazinele de înot. Depistarea a mai puțin de 100 stafilococi/ml indică o calitate necorespunzătoare a apei.

Stafilococii pot fi depistați prin metoda membranelor filtrante, însămânțare directă sau prin titrare.

57.2.5.1. Metoda membranelor filtrante

Se filtrează 50 ml apă prin 2—3 membrane, care se transferă apoi pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou. Se incubează plăcile 24 ore la 37°C. Se numără coloniile bombate, lucioase cu o zonă de opacifiere. Identitatea stafilococilor se confirmă prin microscopia frotiului din coloniile suspecte colorat Gram, testarea lecitinazei și coagulazei. Indicele stafilococilor se calculează după formula indicată mai sus pentru enterococi.

57.2.5.2. Insămânțarea directă

Se insămânțează câte 0,5 ml în 2 cutii sau câte 0,2 ml în 5 cutii Petri cu geloză hiperclorurată cu lapte și ou. După incubare, se numără coloniile suspecte, se identifică și se stabilește indicele stafilococilor ținând cont de volumul de apă insămânțat.

57.2.5.3. Metoda de titrare

În metoda de titrare se insămânțează 10; 1; 0,1 ml apă în mediul de îmbogățire (bulion peptonat cu 10% clorură de sodiu). După 48 ore de incubare la 37°C se fac repicări pe geloză hiperclorurată cu lapte și ou, pentru identificarea ulterioară uzuală a stafilococilor. Indicele și titrul stafilococilor se calculează folosind tabelele standard.

57.2.6. Izolarea microflorei patogene

Analiza microbiologică sanitară a apei pentru depistarea microflorei patogene se face, de regulă, numai la indicații epidemiologice. Aceste examinări sunt justificate în următoarele circumstanțe:

- când indicele coli al apei potabile nu corespunde exigenței standardelor de stat;
- când se selectează surse de aprovizionare centralizată cu apă;
- în zonele de recreație;
- la construcția stațiunilor balneare, caselor de odihnă, instituțiilor de copii;
- pentru aprecierea eficienței instalațiilor de epurare a apelor reziduale.

Probele necesare sunt: 1—3 litri apă potabilă, 1 litru din bazinele deschise, 100 ml apă reziduală, 1—20 g sediment al apelor reziduale. Din bazinele deschise se recoltează probe în locurile stagnante, de la suprafață și de la adâncimea de 50—100 cm.

57.2.6.1. Depistarea salmonelelor

Din apa potabilă și din bazine deschise se insămânțează volume de 200 ml în medii de îmbogățire (e.g. bulion cu selenit, bulion tetrataonat cu verde brillant, mediu cu magneziu). După incubare de 24 ore la 37°C, din fiecare flacon se fac repicări pe plăci cu mediul bismut-sulfid, care sunt incubate 48 ore la 37°C. Coloniile suspecte (rotunde, negre, lucioase) se repică, pentru triajul biochimic, în mediul Olkenițki cu incubare de 24 ore la 37°C. Salmonelele acidifiază coloana mediului (fermentează glucoza) fără a modifica panta (nu fermentează lactoza și zaharoza și nu hidrolizează ureea). Se identifică culturile izolate după caracterele biochimice și serologice.

57.2.6.2. Depistarea shigelelor

Se însămânțează 400 ml apă în 100 ml mediu de îmbogățire (bulion cu selenit sau, mai bine, bulion alcalin Hajna pentru îmbogățirea bacililor gramnegativi). După 24 ore de incubare la 37°C se repică fiecare probă pe câte 5 plăci cu mediu Levine sau Ploskirev, care sunt incubate 24—48 ore la 37°C. Coloniile suspecte, incolore, se repică în mediul Olkenițki, care indică, după 24 ore de incubare la 37°C, numai fermentarea glucozei (acidifierea coloanei). Izolatele sugestive se identifică biochimic (fermentarea glucidelor, producerea indolului, hidrogenului sulfurat ș.a.) și antigenic (reacții de aglutinare pe lamă, inițial cu seruri polivalente, apoi, dacă reacția este pozitivă, cu fiecare ser din amestec).

Serovarurile și subserovarurile se determină cu seruri specifice adsorbite. Pentru determinarea biovarurilor *Sh. sonnei* se însămânțează cultura izolată în medii cu xiloză și ramnoză.

57.2.6.3. Depistarea vibrionilor holerici

Se recoltează probe de 1—2 litri de apă potabilă sau din bazinele deschise, 0,5 litri din ape reziduale și 200 ml depuneri de la fundul rezervorului de apă. Probele marcate se introduc în containere metalice (casolette, cratițe, căldări) și se expediază prin curier special.

Izolarea vibrionilor poate fi efectuată prin metoda membranelor filtrante sau prin însămânțare în medii de îmbogățire. La început se stabilește pH-ul apei, care trebuie alcalinizată cu soluție 10% hidroxid de sodiu până la pH 8,0, apoi se toarnă proba în două recipiente cu volumul de până la 1 litru, în care se adaugă soluție 10% de peptonă, pentru a obține apă peptonată 1% alcalină, mediu electiv pentru vibrionii holerici. După incubare 5 ore la 37°C, pe suprafața mediului apare o peliculă fină azurie, care trebuie repicată în a doua apă peptonată și pe geloză alcalină.

Microscopia pe preparat umed între lamă și lamelă (controlează mobilitatea) și pe frotiu colorat Gram, urmate de reacția de aglutinare pe lamă cu serul specific anti-O:1, permit obținerea unui rezultat preliminar. După încă 5—6 ore coloniile suspecte de pe geloză alcalină, care aglutinează cu serul anti-O:1, se repică pe geloză cu lactoză și zaharoză. Citirea rezultatelor se face după 16—18 ore de termostatare. Vibrionii fermentează zaharoza (acidifierea coloanei). Identificarea definitivă a culturii izolate se face prin testele cunoscute.

57.2.6.4. Depistarea leptospirelor

Pentru depistarea leptospirelor se examinează mai frecvent apa din iazuri, lacuri mici, fluvii, care servesc atât pentru scăldat, cât și pentru adăparea animalelor. Se recoltează minimum 300 ml apă, nămolul de la fund și nisipul. Examinarea se face prin metoda microscopiei directe, bacteriologică și biologică.

Microscopia. Din proba de apă centrifugată sau filtrată prin membrane filtrante se pregătesc cel puțin 10 preparate între lamă și lamelă, care se examinează la microscopul cu fond întunecat.

În *metoda bacteriologică* se însămânțează sedimentul după centrifugare în mediul Vervoort-Wolff (apă sterilă de robinet cu ser de iepure inactivat la 56°C timp de 30 minute) și se incubează cultura 10—15 zile la 28—30°C. Pentru a urmări creșterea leptospirelor, se efectuează preparate între lamă și lamelă de la fundul eprubetei și se examinează la microscopul cu fond întunecat (mediul rămâne transparent). Identificarea leptospirelor se face prin reacția de aglutinare-liză (RAL) cu seruri specifice. Reacția se menține 2 ore în termostat la 30°C. Pe preparatele între lamă și lamelă observăm la început aglutinarea leptospirelor cu aspect de păianjen, apoi se pierde mobilitatea și leptospirele se dezintegrează în formațiuni granulare.

Metoda biologică constă în infectarea percutană a cobailor cu pielea de pe abdomen și flancuri epilată și scarificată. Se mențin animalele astfel pregătite timp de 2 ore în apa de examinat încălzită la 30°C. Dacă apa conține leptospire, animalele se îmbolnăvesc după 5—11 zile: temperatura se ridică până la 40—41°C, apare icterul sclerei, membranelor mucoase și a pielii. Sângele și organele animalelor decedate sau sacrificate îl însămânțăm în mediul Vervoort-Wolff, pentru a obține cultura pură de leptospire.

57.3. APRECIEREA CALITĂȚII APEI DUPĂ INDICATORII BACTERIOLOGICI

În raport cu prevederile standardelor de stat, apa de robinet urmează să conțină cel mult 100 microorganisme/ml, indicele coli să fie de cel mult 3 și titrul coli mai mare de 333. Apa bazinelor de înot trebuie să corespundă aceluiași exigențe ca și apa de robinet; titrul enterococilor să fie de cel puțin 10, iar stafilococi se admit până la 20 UFC/litru.

Pentru apa potabilă din fântâni, izvoare este stabilit indicele coli până la 10 și titrul coli de cel puțin 100.

În apa din sursele de alimentare preconizate pentru o aprovizionare centrală cu clorinare se admite un titru coli de cel puțin 1 și indicele coli de cel mult 1000. Dacă aceeași sursă se preconizează a fi utilizată după o epurare completă și clorinare, titrul coli se cere să fie mai mare de 0,1 și indicele coli mai mic de 10 000.

Indicele stafilococilor în zonele de recreație nu trebuie să depășească 100.

Apa bazinelor care conține enterococi și *E. coli* mai mult de 1000/ litru este considerată impurificată și periculoasă din punct de vedere epidemiologic.

Sursele de apă nu trebuie să conțină floră patogenă.