МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31955— 2012 (ISO 9308-1:2000)

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий

Часть 1

Метод мембранной фильтрации

(ISO 9308-1:2000, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Обществом с ограниченной ответственностью «Протектор» совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» на основе собственного аутентичного перевода указанного в пункте 4 международного стандарта

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 343 «Качество воды»)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 3 декабря 2012 г. № 54)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Армгосстандарт
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 9308-1:2000 Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method (Качество воды. Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации) путем:

- изменения структуры. Сравнение структуры международного стандарта со структурой настоящего стандарта приведено в приложении ДА;
- внесения дополнительных положений, фраз и слов, что обусловлено учетом потребностей национальной экономики и особенностей межгосударственной стандартизации, выделенных в тексте настоящего стандарта курсивом.

Положения, выделенные в тексте стандарта вертикальной линией, расположенной слева от текста, заменяют ссылку на международный стандарт ISO 8199:1988.

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5—2001 (подраздел 3.6).

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в приложении ДБ.

Степень соответствия — модифицированная (MOD).

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52426—2005

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2012 г. № 1904-ст межгосударственный стандарт введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2014 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта публикуется в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Оборудование, *материалы* . . . 3
6 Культуральные среды, реактивы, *культуры микроорганизмов* . . . 4
7 Отбор проб . . . 5
8 Проведение испытаний . . . 5
9 Обработка результатов испытаний . . . 7
10 Оформление результатов . . . 7
11 Обеспечение качества проведения испытаний . . . 7
Приложение А (справочное) Дополнительные характеристики колиформных бактерий и E.coli . . . 8
Приложение В (обязательное) Методики приготовления культуральных сред и реактивов . . . 9
Приложение ДА (справочное) Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта . . . 12
Приложение ДБ (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам . . . 14
Библиография . . . 15

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий

Часть 1

Метод мембранной фильтрации

Drinking water. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
Part 1. Membrane filtration method

Дата введения — 2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и количественного учета *Escherichia coli* (далее — *E.coli*) и колиформных бактерий в воде, предназначенной для потребления человеком (далее — питьевой воде), в стандартных условиях испытаний (далее — стандартный тест) и при ускоренных испытаниях (далее — ускоренный тест).

Стандартный тест основан на мембранной фильтрации пробы питьевой воды с последующим культивированием отфильтрованных микроорганизмов на дифференцирующей агаризованной среде и вычислении количества *E.coli* и колиформных бактерий в пробе. В стандартном тесте используют среду с низкой селективностью для обнаружения поврежденных при подготовке питьевой воды бактерий. Вследствие низкой селективности среды фоновый рост микроорганизмов может отрицательно влиять на достоверность количественного учета микроорганизмов, например в водах неглубоких колодцев, не прошедших обеззараживания. Поэтому стандартный тест предназначен для испытаний воды, прошедшей обеззараживание, или воды с низкой численностью бактерий, *качество которой соответствует первому классу подземных источников по ГОСТ 2761*.

Ускоренный тест предназначен для обнаружения в питьевой воде *E.coli* в течение 24 ч при необходимости быстрого получения результатов испытаний. Ускоренный тест также основан на мембранной фильтрации пробы питьевой воды с последующим культивированием отфильтрованных микроорганизмов на селективных средах и вычислении количества *E.coli* в пробе.

Настоящий стандарт может быть использован и для других типов воды при условии, что взвешенные вещества и фоновая микрофлора не оказывают отрицательного влияния на фильтрацию, культивирование и учет микроорганизмов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2761—84 Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора

Издание официальное

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5208—81 Спирт бутиловый нормальный технический. Технические условия

ГОСТ 5830—79 Реактивы. Спирт изоамиловый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17626—81 Казеин технический. Технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия*

ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31942—2012 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылк.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями, *включающие признаки и характеристики бактерий*:

3.1 **лактозоположительные бактерии** (lactose-positive bacteria): Бактерии, способные к образованию колоний в аэробных условиях при (36 ± 2) °С на селективной дифференцирующей лактозной культуральной среде с образованием кислоты в течение (21 ± 3) ч при испытании по стандартному тесту.

3.2 **колиформные бактерии** (coliform bacteria): Лактозоположительные бактерии, являющиеся оксидазоотрицательными при испытаниях по стандартному тесту.

3.3 ***Escherichia coli*** (*E.coli*): Колиформные бактерии, которые продуцируют также индол из триптофана при (44,0 ± 0,5) °С в течение (21 ± 3) ч при испытаниях по стандартному тесту.

3.4 ***Escherichia coli*** (*E.coli*): Устойчивые к желчи бактерии, которые продуцируют также индол из триптофана при (44,0 ± 0,5) °С в течение (21 ± 3) ч при испытаниях по ускоренному тесту.

Примечание — Дополнительная характеристика колиформных бактерий и E.coli приведена в приложении А.

4 Сущность метода

4.1 Основные положения

Сущность метода заключается в фильтровании проб питьевой воды заданного объема через мембранные фильтры, инкубации отфильтрованных микроорганизмов на заданных средах в заданных условиях, идентификации выросших колоний, их количественной оценке и подтверждении этой оценки с помощью стандартного и (или) ускоренного тестов.

Стандартный тест предусматривает инкубацию мембраны на селективной среде с последующим биохимическим подтверждением типичных лактозоположительных колоний, позволяющим обнаружить и провести количественный учет колиформных бактерий и *E.coli* в течение 2—3 сут.

Ускоренный тест состоит из двух этапов инкубации, позволяющих обнаружить и провести количественный учет *E.coli* в течение (21 ± 3) ч.

---

* *В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия».*

4.2 Фильтрация и инкубация

Исследуемые объемы пробы питьевой воды фильтруют через мембраны, удерживающие микроорганизмы.

При испытаниях по стандартному тесту мембрану помещают на селективную лактозную агаризованную культуральную среду и проводят инкубацию отфильтрованных микроорганизмов при *температуре* (36 ± 2) °С в течение (21 ± 3) ч; при испытаниях по ускоренному тесту мембрану помещают на агаризованную среду, содержащую казеин трипсиновой ферментации, и проводят инкубацию при *температуре* (36 ± 2) °С в течение 4—5 ч с последующей инкубацией при *температуре* (44,0 ± 0,5) °С в течение 19—20 ч на агаризованной среде, содержащей казеин трипсиновой ферментации и соли желчи.

4.3 Оценка и подтверждение (стандартный тест)

Характерные колонии *(8.3.2)* на мембране учитывают как колонии лактозоположительных бактерий. Для подтверждения наличия колиформных бактерий и *E.coli* выполняют пересев случайно выбранных характерных колоний и проводят испытания, подтверждающие отсутствие их оксидазной активности и образование индола. Вычисляют количество колиформных бактерий и *E.coli* в 100 мл пробы питьевой воды.

4.4 Оценка и подтверждение (ускоренный тест)

Колонии на мембране, обладающие свойством образовывать индол из внесенного в агаризованную среду L-триптофана, учитывают как колонии *E.coli*. Вычисляют количество *E.coli* в 100 мл пробы питьевой воды.

5 Оборудование, *материалы*

Для проведения испытаний применяют обычное микробиологическое оборудование, в частности, указанное ниже:

5.1 Стерилизатор паровой.

5.2 Водяная баня или термостат, обеспечивающие поддержание температуры (36 ± 2) °С.

5.3 Водяная баня или термостат, обеспечивающие поддержание температуры (44,0 ± 0,5) °С.

Примечание — Для ускоренного теста вместо термостатов, указанных *в 5.2 и 5.3*, допускается использовать программируемый термостат, обеспечивающий *смену режимов инкубации через определенный интервал времени и* поддержание температуры (36 ± 2) °С и (44,0 ± 0,5) °С.

5.4 pH-метр, обеспечивающий измерение водородного показателя pH с допускаемой погрешностью ±0,1.

5.5 Оборудование для мембранной фильтрации*.

5.6 Фильтры* мембранные, изготовленные из эфирцеллюлозных материалов, диаметром, как правило, от 47 до 50 мм, с номинальным диаметром пор 0,45 мкм, и, предпочтительно, с нанесенной сеткой *(для концентрирования микроорганизмов)*.

5.7 Фильтры мембранные с номинальным диаметром пор 0,2 мкм (для стерилизации растворов).

5.8 Пинцет плоскоконечный для работы с мембранными фильтрами.

Примечание — Мембранные фильтры не должны обладать свойствами, ингибирующими или стимулирующими рост микроорганизмов. Чернила, используемые для нанесения сетки, не должны оказывать влияние на рост бактерий. Если мембранные фильтры поставляют нестерильными, их следует простерилизовать в соответствии с инструкциями изготовителя. Качество каждой партии мембран следует контролировать**, поскольку использование различных торговых марок фильтров может привести к различиям в формировании *колоний и их* окраски.

При ускоренном тесте для лучшего выявления образования окраски используют мембранные фильтры зеленого цвета.

5.9 Лампа ультрафиолетовая с длиной волны 254 нм.

Примечание — При работе с ультрафиолетовой лампой используют защитные очки и перчатки, так как ультрафиолетовое излучение вызывает раздражение глаз и кожи.

5.10 Подложки под фильтры диаметром не менее диаметра используемого фильтра.

---

* *В Российской Федерации — согласно [1].*

** *В Российской Федерации — согласно [2].*

5.11 Пипетки вместимостью 1,0, 5,0, 10,0 мл с ценой деления 0,1 мл (многоразового или одноразового использования) по ГОСТ 29227.

5.12 Пробирки (многоразового или одноразового использования) по ГОСТ 25336.

5.13 Посуда мерная лабораторная стеклянная 2-го класса точности по ГОСТ 1770: цилиндры вместимостью 100, 250, 500 мл; пробирки мерные вместимостью 10, 15, 20 мл.

5.14 Чашки бактериологические (Петри) стеклянные по ГОСТ 23932 или пластмассовые однократного применения, диаметром 60 мм.

5.15 Палочки стеклянные.

5.16 Пластмассовые или платиновые бактериологические петли.

5.17 Деревянный аппликатор.

5.18 Пробки силиконовые, выдерживающие стерилизацию сухим жаром.

5.19 Пластмассовые или металлические крышки (колпачки).

5.20 Горелки газовые или спиртовки по ГОСТ 25336.

5.21 Средства защиты (очки, резиновые перчатки.).

Материалы и лабораторная посуда, поставляемые нестерильными, стерилизуют в соответствии с требованиями *ГОСТ 31942.*

Допускается применять другие средства измерений, оборудование и материалы, с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

6 Культуральные среды, реактивы, *культуры микроорганизмов*

6.1 Культуральные среды, исходные вещества для приготовления культуральных сред и реактивы:

2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорид (ТТХ).

L-триптофан.

р-диметиламинобензальдегид.

Агар (в форме порошка или хлопьев) по ГОСТ 17206.

Амиловый спирт по ГОСТ 5830.

Бромтимоловый синий.

Бутиловый спирт по ГОСТ 5208.

Гептадецилсульфат натрия (тергитол 7).

Диметил-р-фенилендиамин дигидрохлорид.

Дрожжевой экстракт.

Казеин трипсиновой ферментации по ГОСТ 17626.

Лактоза.

Лактозный ТТХ агар с гептадецилсульфатом натрия.

Мясной экстракт.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

α-нафтол.

Пептон по ГОСТ 13805.

Реактив для индольного теста.

Реактив Ковача.

Соевый пептон.

Соли желчи.

Соляная кислота по ГОСТ 3118.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Тетраметил-р-фенилендиамин гидрохлорид.

Тест-системы для оксидазного теста.

Триптон.

Триптон-желчный агар (ТЖА).

Триптон-соевый агар неселективный (ТСА).

Фуксин-сульфитная среда Эндо (среда Эндо).*

6.2 Культуральные среды и реактивы готовят в соответствии с приложением В из исходных веществ одинакового качества и аналитической степени чистоты или применяют коммерческие готовые среды, реактивы и *тест-системы*, состав которых соответствует рецептурам, приведенным в приложении В, строго следуя инструкциям изготовителя.

---

* *Среду Эндо готовят, как указано в [1].*

Примечание — Допускается применять исходные вещества для приготовления культуральных сред и реактивы другой степени чистоты при условии отсутствия различий в результатах испытаний.

Для приготовления культуральных сред *и реактивов* применяют дистиллированную воду *по ГОСТ 6709* или деионизированную воду, не содержащую веществ, способных ингибировать рост бактерий в условиях проведения испытаний. *Удельная электрическая проводимость воды, используемой для приготовления культуральных сред и реактивов, должна составлять не более 3,0 мкСм/см.* Дистиллированную или деионизированную воду хранят в стеклянной посуде.

Если не указано иное, приготовленные по приложению В культуральные среды и реактивы являются стабильными не менее одного месяца, при хранении в защищенном от света и высыхания месте при *температуре* (5 ± 3) °С.

7 Отбор проб

Пробы питьевой воды отбирают и транспортируют в соответствии с требованиями *ГОСТ 31942*.

8 Проведение испытаний

8.1 Подготовка пробы *воды и мембранных фильтров*

Подготовку пробы воды *и мембранных фильтров* перед фильтрацией и посевом *микроорганизмов* на селективные среды проводят в соответствии *с ГОСТ 31942**.

Испытания проводят сразу после отбора проб.

Если пробы транспортируют и хранят при температуре окружающей среды не выше 25 °С в защищенном от света месте, то испытания начинают не позднее чем через *2* ч после отбора пробы.

В исключительных случаях пробы допускается хранить при температуре (5 ± 3) °С не более *6* ч до начала проведения испытаний.

8.2 Фильтрация

Фильтруют 100 мл или больший объем исследуемой пробы (например, *300* мл — для воды, расфасованной в емкости), используя мембранный фильтр и оборудование для мембранной фильтрации.

При фильтрации воды неизвестного качества целесообразно увеличить количество фильтруемых объемов для получения изолированных колоний на фильтре (например 10, 40, 100, 150 мл пробы воды).

После окончания фильтрации мембранный фильтр помещают на соответствующую агаризованную среду по 8.3 *или* 8.4, обеспечивая отсутствие пузырьков воздуха под мембранным фильтром.

8.3 Инкубация и подтверждение (стандартный тест)

8.3.1 После фильтрации по 8.2 помещают мембранный фильтр на чашку Петри с лактозным ТТХ агаром с гептадецилсульфатом натрия (далее — среда с тергитолом 7), приготовленным по В.1 (приложение В), и проводят инкубацию посева микроорганизмов при *температуре* (36 ± 2) °С в течение (21 ± 3) ч. *Вместо среды с тергитолом 7 допускается применять среду Эндо.*

Примечания

1 Если после инкубации посева микроорганизмов в течение (21 ± 3) ч не обнаружены типичные колонии микроорганизмов, то увеличивают продолжительность инкубации до (44 ± 4) ч, что может привести к повышению чувствительности метода.

2 Для обнаружения *E.coli* допускается использовать дополнительный мембранный фильтр для инкубации посева микроорганизмов при *температуре* 44 °С, что *будет* способствовать подавлению роста сопутствующих микроорганизмов.

8.3.2 После окончания инкубации учитывают как колонии лактозоположительных бактерий все выросшие характерные колонии микроорганизмов независимо от размера:

- на среде с тергитолом 7 — колонии *с желто-оранжевой, кирпично-красной окраской, иногда с ржаво-окрашенным центром,* образующие желтую окраску в среде под мембраной *(отпечаток);*

- *на среде Эндо — колонии с темно-красной окраской с металлическим блеском или без него, слизистые с красным центром и отпечатком на оборотной стороне фильтра.*

---

* *В Российской Федерации — также с учетом требований [1] и ГОСТ Р 51426 (при необходимости разведения пробы).*

8.3.3 Оксидазный и индольный тесты

Для подтверждения наличия в пробе питьевой воды колиформных бактерий и *E.coli* проводят пересев всех или представительного количества (не менее 10) характерных изолированных колоний микроорганизмов *(имеющих окраску по 8.3.2)* в чашки Петри на неселективный триптон-соевый агар (ТСА), приготовленный по В.3 (приложение В) *методом, позволяющим получить изолированные колонии*, и в пробирки в триптофановый бульон, приготовленный по В.2 (приложение В).

Инкубируют посевы микроорганизмов на неселективном ТСА в чашках Петри при *температуре* (36 ± 2) °С в течение (21 ± 3) ч и выполняют оксидазный тест следующим способом.

Две, три капли свежеприготовленного по В.5.3 (приложение В) реактива для оксидазного теста помещают на фильтровальную бумагу. Затем стеклянной палочкой, деревянным аппликатором, пластиковой или платиновой бактериологической петлей растирают часть колоний микроорганизмов на обработанной реактивом фильтровальной бумаге. Появление насыщенной сине-фиолетовой окраски в течение 30 с считают положительной оксидазной реакцией, указывающей на оксидазную активность. *Отсутствие изменения окраски указывает на отсутствие оксидазной активности (отрицательную оксидазную реакцию).*

В случае роста на неселективном ТСА колоний разной морфологии, оксидазный тест выполняют на 2—3 колониях каждого типа.

Все колонии микроорганизмов, дающие отрицательную оксидазную реакцию, учитывают как колонии колиформных бактерий и подсчитывают их.

Инкубируют посев микроорганизмов в пробирке с триптофановым бульоном, приготовленным по В.2 (приложение В), при *температуре* (44,0 ± 0,5) °С в течение (21 ± 3) ч, после чего определяют образование индола путем добавления 0,2—0,3 мл реактива Ковача, приготовленного по В.5.1 (приложение В).

Образование вишнево-красной окраски на поверхности триптофанового бульона считают положительной индольной реакцией, подтверждающей образование индола.

Все колонии микроорганизмов, дающие отрицательную оксидазную реакцию и положительную индольную реакцию, учитывают как колонии *E.coli* и подсчитывают их.

При использовании коммерческих тест-систем выполнение оксидазного и индольного тестов осуществляют согласно инструкциям изготовителя.

Примечания

1 В особых случаях может быть проведена идентификация колиформных бактерий, например для разделения бактерий, имеющих фекальное и нефекальное происхождение.

2 В особых случаях при обнаружении выросших по 8.3.1 колоний, не имеющих характерной окраски по 8.3.2 и не обладающих оксидазной активностью, может быть проведена их идентификация на принадлежность к бактериям семейства Enterobacteriaceae по методикам, разработанным и аттестованным в установленном порядке.

8.3.4 Допускается проводить одновременное определение оксидазной активности всех выросших на среде Эндо по 8.3.1 колоний микроорганизмов непосредственно на мембранном фильтре без пересева по 8.3.3. Для этого в чашку Петри помещают фильтровальную бумагу и обильно смачивают реактивом для оксидазного теста тетраметилом-р-фенилендиамином, приготовленным по варианту 1 [см. В.5.3 (приложение В)]. Затем переносят стерилизованным пинцетом мембранный фильтр с выросшими на нем по 8.3.1 колониями микроорганизмов на фильтровальную бумагу. Появление насыщенной сине-фиолетовой окраски всей колонии или ее ободка в течение 1—4 мин считают положительной оксидазной реакцией, указывающей на оксидазную активность.

При работе с реактивом для оксидазного теста (диметил-р-фенилендиамином), приготовленным по варианту 2 [см. В.5.3 (приложение В)], мембранный фильтр с выросшими на нем колониями с питательной средой перекладывают на кружок фильтровальной бумаги, обильно смоченный данным реактивом для оксидазного теста. При появлении первых признаков положительной реакции (синее окрашивание колоний), но не более чем через 4 мин, в случае необходимости дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных бактерий мембранный фильтр переносят обратно на питательную среду. Пересев колоний на подтверждающие среды целесообразно проводить не сразу же после проявления реакции, а после выдерживания на питательной среде свыше 5 мин.

Колонии микроорганизмов, дающие положительную оксидазную реакцию, не учитывают. Колонии, не изменившие окраски (отрицательная оксидазная реакция), учитывают как колонии колиформных бактерий и подсчитывают их.

8.4 Инкубация и подтверждение (ускоренный тест)

После фильтрации по 8.2 мембранный фильтр помещают на триптон-соевый агар (ТСА), приготовленный по В.3 (приложение В), и инкубируют посев микроорганизмов при *температуре* (36 ± 2) °С в течение 4—5 ч. Затем переносят мембранный фильтр на триптон-желчный агар (ТЖА), приготовленный по В.4 (приложение В), и продолжают инкубацию посева микроорганизмов при *температуре* (44,0 ± 0,5) °С в течение 19—20 ч.

Допускается объединение двух агаризованных сред в одной чашке Петри в виде двух слоев в соответствии с В.4 (приложение В). При этом помещают мембранный фильтр на свежеприготовленную двуслойную среду, состоящую из ТСА (или питательного агара с добавлением 1 г/л L-триптофана) и ТЖА, и проводят инкубацию сначала при *температуре* (36 ± 2) °С в течение 4—5 ч, а затем при *температуре* (44,0 ± 0,5) °С в течение 19—20 ч.

После инкубации мембранный фильтр помещают на подложку для фильтра, смоченную реактивом для индольного теста по В.5.2 (приложение В), и облучают ультрафиолетовой лампой от 10 до 30 мин в зависимости от скорости образования окраски. Все красные колонии микроорганизмов на мембранном фильтре учитывают как колонии *E.coli* и подсчитывают их.

Примечания

1 Коммерческие реактивы на водной основе могут давать более четкие и быстрые результаты без применения ультрафиолетового облучения.

2 Неравномерное распределение колоний микроорганизмов на фильтре или обильный рост сопутствующих микроорганизмов могут мешать идентификации колоний микроорганизмов с положительной реакцией на образование индола из-за диффузии окраски в прилегающие колонии микроорганизмов.

9 Обработка результатов испытаний

По результатам испытаний по разделу 8, исходя из подсчитанного на мембранном фильтре количества характерных колоний микроорганизмов и принимая во внимание результаты выполненных подтверждающих тестов, вычисляют количество колиформных бактерий и *E.coli* и, если необходимо, лактозоположительных бактерий, присутствующих в 100 мл пробы питьевой воды.

Результат испытаний выражают числом колониобразующих единиц (КОЕ) E.coli или колиформных бактерий в 100 мл воды.

При фильтрации пробы объемом более 100 мл или нескольких объемов пробы воды на разных мембранных фильтрах результат испытаний вычисляют аналогично определению общих колиформных бактерий.*

При отсутствии бактерий на всех используемых фильтрах в качестве результата испытаний в протоколе испытаний приводят следующий текст: «Не обнаружено КОЕ E.coli в 100 мл воды» или «Не обнаружено КОЕ колиформных бактерий в 100 мл воды».

Если оба теста (стандартный и ускоренный) применяют параллельно, окончательным результатом по обнаружению и учету *E.coli* является тот, который показывает большее число КОЕ *E.coli*.

10 Оформление результатов

Полученные результаты регистрируют в протоколах испытаний *согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025*, в которых в обязательном порядке указывают:

- обозначение настоящего стандарта;
- информацию, необходимую для идентификации пробы;
- результаты испытаний, полученные по разделу 9;
- любые отклонения, наблюдавшиеся в течение испытаний, и любые процедуры, не указанные в настоящем стандарте, которые могли повлиять на результат испытаний.

11 Обеспечение качества проведения испытаний

Лаборатории, проводящие испытания, должны иметь систему контроля качества, *соответствующую требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025*, чтобы гарантировать, что используемые оборудование, реактивы и методы испытаний соответствуют требованиям настоящего стандарта.

---

* *В Российской Федерации — вычисляют по [1], аналогично определению общих колиформных бактерий.*

Приложение А
(справочное)

Дополнительные характеристики колиформных бактерий и *E.coli*

А.1 Колиформные бактерии являются грамотрицательными, оксидазоотрицательными, не образующими спор палочками, способными расти в аэробных и факультативно анаэробных условиях в присутствии солей желчи (или других поверхностно-активных веществ со сходными рост-ингибирующими свойствами), которые способны ферментировать лактозу с образованием кислоты и альдегида за 48 ч при *температуре* (36 ± 2) °С.

Колиформные бактерии также имеют фермент β-галактозидазу.

А.2 *E.coli* являются колиформными бактериями, способными образовывать индол из L-триптофана за (21 ± 3) ч при *температуре* (44,0 ± 0,5) °С. Они обладают свойством давать положительную реакцию в тесте с метиловым красным и могут декарбоксилировать L-глютаминовую кислоту, но не обладают свойством образовывать ацетилметилкарбинол, использовать цитрат в качестве единственного источника углерода или расти в бульоне с цианидом калия.

E.coli также имеют фермент β-глюкуронидазу.

Приложение В
(обязательное)

Методики приготовления культуральных сред и реактивов

В.1 Лактозный ТТХ агар с гептадецилсульфатом натрия *(среда с тергитолом 7)*

В.1.1 Базовая среда

Состав:
лактоза — 20 г;
пептон — 10 г;
дрожжевой экстракт — 6 г;
мясной экстракт — 5 г;
бромтимоловый синий — 0,05 г;
агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—20 г;
дистиллированная вода — 1000 мл.

Примечание — Массу агара выбирают в зависимости от его свойств к гелеобразованию.

Растворяют все указанные ингредиенты в дистиллированной воде при нагревании. Устанавливают значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно было равно (7,2 ± 0,1) при *температуре* 25 °С.

Разливают полученную среду в емкости вместимостью не более 250 мл и стерилизуют в течение 15 мин при *температуре* (121 ± 3) °С.

В.1.2 Раствор 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ)

Состав:
2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорид (ТТХ) — 0,05 г;
дистиллированная вода — 100 мл.

Растворяют ТТХ в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл. Стерилизуют раствор фильтрацией через мембрану с номинальным размером пор 0,2 мкм.

В.1.3 Раствор гептадецилсульфата натрия

Состав:
гептадецилсульфат натрия (тергитол 7) — 0,2 г;
дистиллированная вода — 100 мл.

Растворяют гептадецилсульфат натрия (тергитол 7) в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл. Раствор стерилизуют в течение 15 мин при *температуре* (121 ± 3) °С.

В.1.4 Среда полного состава

Состав:
базовая среда (см. В.1.1) — 100 мл;
раствор ТТХ (см. В.1.2) — 5 мл;
раствор гептадецилсульфата натрия (см. В.1.3) — 5 мл.

Расплавляют базовую среду (см. В.1.1) и охлаждают до *температуры* (50 ± 5) °С. Соблюдая стерильность, добавляют в колбу с охлажденной базовой средой растворы ТТХ (см. В.1.2) и гептадецилсульфата натрия (см. В.1.3), тщательно перемешивают, избегая образования пузырей, затем разливают в чашки Петри с образованием слоя толщиной не менее 5 мм. Полученную среду хранят в защищенном от света месте при *температуре* (5 ± 3) °С не более 10 сут.

В.2 Триптофановый бульон

Состав:
казеин трипсиновой ферментации — 10 г;
L-триптофан — 1 г;
натрий хлористый — 5 г;
дистиллированная вода — до 1000 мл.

Указанные ингредиенты растворяют при нагревании в дистиллированной воде и разливают по 3 мл в пробирки. Затем стерилизуют в течение 15 мин при *температуре* (121 ± 3) °С. Значение pH готовой к использованию среды — (7,5 ± 0,1) при *температуре* 25 °С.

Примечание — *Если результаты контроля* качества среды* показывают достаточное количество L-триптофана в используемом казеине трипсиновой ферментации, то его в среду не добавляют, а дополнительно вносят 10 г казеина трипсиновой ферментации.

* *В Российской Федерации контроль качества среды проводят согласно [2].*

В.3 Неселективный триптон-соевый агар (ТСА)

Состав:
казеин трипсиновой ферментации — 15 г;
соевый пептон — 5 г;
натрий хлористый — 5 г;
агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—25 г;
дистиллированная вода — до 1000 мл.

Примечание — Массу агара выбирают в зависимости от его свойств к гелеобразованию.

Указанные ингредиенты растворяют при нагревании в дистиллированной воде. Устанавливают значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно было равно (7,2 ± 0,1) при *температуре* 25 °С. Разливают полученную среду в емкости вместимостью не более 250 мл и стерилизуют в течение 15 мин при *температуре* (121 ± 3) °С. Затем среду охлаждают при комнатной температуре до (50 ± 5) °С и разливают в чашки Петри с образованием слоя толщиной не менее 5 мм.

Примечания

1 Для оксидазного теста вместо ТСА может применяться любой неселективный агар с низким содержанием ферментируемых углеводов.

2 *Для приготовления двуслойной среды вместо ТСА может быть использован питательный агар (приготовленный в соответствии с инструкцией изготовителя) с добавлением L-триптофана в концентрации 1 г/дм^3.*

В.4 Триптон-желчный агар (ТЖА)

Состав:
триптон — 20 г;
соли желчи — 1,5 г;
агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—25 г;
дистиллированная вода — до 1000 мл.

Примечание — Массу агара выбирают в зависимости от его свойств к гелеобразованию.

Указанные ингредиенты растворяют при кипячении в дистиллированной воде. Устанавливают значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно было равно (7,2 ± 0,1) при *температуре* 25 °С. Разливают среду в емкости вместимостью не более 250 мл и стерилизуют в течение 15 мин при *температуре* (121 ± 3) °С. Затем среду охлаждают при комнатной температуре до (50 ± 5) °С и разливают в чашки Петри с образованием слоя толщиной не менее 5 мм.

Чашки с двуслойной средой готовят путем заливки горячего ТСА (см. В.3) температурой (50 ± 5) °С поверх затвердевшей среды ТЖА, разлитой в чашки, нагретые до комнатной температуры. Используют такой объем ТСА, который образует слой толщиной около 1 мм (например 2,5 мл в чашке Петри диаметром 55 мм). После затвердения двуслойной среды, при необходимости, ее подсушивают в термостате при *температуре* (36 ± 2) °С, перевернув чашки вверх дном. Для каждого анализа готовят свежие двуслойные среды (за 30— 60 мин до размещения мембранных фильтров в чашках Петри со средой).

В.5 Реактивы

В.5.1 Реактив Ковача для индольного теста (стандартный тест)

Состав:
p-диметиламинобензальдегид — 5 г;
амиловый или бутиловый спирт (не содержащий органических оснований) — 75 мл;
соляная кислота плотностью 1,18 г/мл — 25 мл.

Растворяют альдегид в спирте. Осторожно добавляют концентрированную соляную кислоту. Реактив хранят при *температуре* (5 ± 3) °С в защищенном от света месте.

Примечания

1 Цвет реактива должен быть от светло-желтого до светло-коричневого; при использовании амилового спирта неудовлетворительного качества реактив приобретает темную окраску.

2 Приготовление реактива проводят в вытяжном шкафу. При этом необходимо использовать защитные перчатки и очки и избегать контакта с *p*-диметиламинобензальдегидом. Амиловый спирт может вызывать раздражение слизистых оболочек и головокружение.

В.5.2 Реактив для индольного теста (ускоренный тест)

Состав:
p-диметиламинобензальдегид — 0,5 г;
соляная кислота молярой концентрации 1 моль/л — 100 мл.

Растворяют *p*-диметиламинобензальдегид в соляной кислоте (по В.5.1, примечание 2).

Реактив хранят в непрозрачной емкости при *температуре* (5 ± 3) °С. Реактив должен быть светло-желтого цвета; если цвет становится коричневато-желтым, реактив не используют.

В.5.3 Реактив для оксидазного теста

Вариант 1.

Состав:

тетраметил-*p*-фенилендиамин гидрохлорид — 0,1 г;

дистиллированная вода — 10 мл.

Реактив нестабилен, и его необходимо готовить непосредственно перед испытаниями и сразу же использовать. Хранить реактив не допускается.

Вариант 2.

Состав:

1 %-ный спиртовой раствор α-нафтола (раствор N 1);

1 %-ный водный раствор диметил-р-фенилендиамина дигидрохлорида (раствор № 2).

Срок хранения растворов в емкостях из темного стекла с притертыми пробками составляет: не более 1 мес — раствора № 1; не более 7 сут — раствора № 2.

Перед использованием для испытания реактив для оксидазного теста готовят следующим образом: к 2,5 частям раствора № 1 добавляют 7,5 частей раствора № 2.

Примечания

1 *Все* перечисленные реактивы являются канцерогенными. Работу по приготовлению реактивов следует выполнять в вытяжном шкафу, используя защитные перчатки и избегая контакта реактива с кожей.

2 *Для постановки оксидазного теста допускается использовать коммерческие тест-системы.*

Приложение ДА
(справочное)

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта

ДА.1 Сравнение структуры международного стандарта ISO 9308-1:2000 со структурой межгосударственного стандарта приведено в таблице ДА.1. Указанное в таблице ДА.1 изменение структуры межгосударственного стандарта относительно структуры примененного международного стандарта обусловлено приведением в соответствие с требованиями, установленными в ГОСТ 1.5.

Таблица ДА.1

Структура международного стандарта ISO 9308-1:2000			Структура межгосударственного стандарта		
Раздел 1			Раздел 1		
Раздел 2			Раздел 2		
Раздел 3			Разделы 3		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
3.1	—	—	3	3.1	—
3.2	—	—		3.2	—
3.3	—	—		3.3	—
3.4	—	—		3.4	—
Раздел 4			Раздел 4		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
4.1	—	—	4	4.1	—
4.2	—	—		4.2	—
4.3	—	—		4.3	—
4.4	—	—		4.4	—
Раздел 5			Раздел 5		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
5.1	—	—	5	5.1	—
5.2	—	—		5.2	—
5.3	—	—		5.3	—
5.4	—	—		5.4	—
5.5	—	—		5.5	—
5.6	—	—		5.6	—
5.7	—	—		5.8	—
5.8	—	—		5.9	—
5.9	—	—		5.10	—
Раздел 6			Подраздел 6.2		
Раздел 7			Раздел 7		
Раздел 8			Раздел 8		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
8.1	—	—	8	8.1	—
8.2	—	—		8.2	—
8.3	—	—		8.3	—
8.4	—	—		8.4	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура международного стандарта ISO 9308-1:2000		Структура межгосударственного стандарта	
Раздел 9		Раздел 9	
Раздел 10		Раздел 10	
Раздел 11		Раздел 11	
Приложение А	—	Приложение А	А.1, А.2
Приложение В	В.1	Приложение В	В.1
	В.1.1		В.1.1
	В.1.2		В.1.2
	В.1.3		В.1.3
	В.1.4		В.1.4
	В.2		В.2
	В.3		В.3
	В.4		В.4
	В.5		В.5
	В.5.1		В.5.1
	В.5.2		В.5.2
	В.5.3		В.5.3
—		Приложение ДА	
—		Приложение ДБ	
Библиография		Библиография	

Приложение ДБ
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДБ.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO/IEC 17025—2005 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий	IDT	ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий
ISO 1042:1998 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой ISO 4788:1980* Посуда лабораторная стеклянная. Градуированные мерные цилиндры	MOD	ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
—	—	ГОСТ 2761—84 Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора
—	—	ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ISO 6353-1:1982 Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний ISO 6353-2:1983 Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия	NEQ	ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
—	—	ГОСТ 5208—81 Спирт бутиловый нормальный технический. Технические условия
—	—	ГОСТ 5830—79 Реактивы. Спирт изоамиловый. Технические условия
—	—	ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
—	—	ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия
—	—	ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия
ISO 5739:1983** Казеины и казеинаты. Определение содержания пригорелых частиц	MOD	ГОСТ 17626—81 Казеин технический. Технические условия
—	—	ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

* Заменен на ISO 4788:2005.
** Заменен на ISO 5739:2003.

Окончание таблицы ДБ.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 1773:1976* Посуда лабораторная стеклянная. Узкогорлые колбы для кипячения	MOD	ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия
ISO 4797:1981** Посуда лабораторная стеклянная. Колбы с коническими шлифами		
ISO 1773:1976* Посуда лабораторная стеклянная. Узкогорлые колбы для кипячения	MOD	ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ISO 3819:1985 Посуда лабораторная стеклянная. Стаканы		
ISO 4797:1981** Посуда лабораторная стеклянная. Колбы с коническими шлифами		
ISO 835-1—81*** Посуда лабораторная стеклянная. Мерные пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования	MOD	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ISO 19458:2006 Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа	MOD	ГОСТ 31942—2012 (ИСО 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:
- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты;
- NEQ — неэквивалентные стандарты.

* Заменен на ISO 1773:1997.
** Заменен на ISO 4797:2004.
*** Заменен на ISO 835:2007.

Библиография

*[1] Методические указания МУК 4.2.1018—2001**	*Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.*
*[2] Методические указания МУ 2.1.4.1057—2001**	*Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.*

* *Действуют в Российской Федерации.*

УДК 663.6:006.354	МКС 07.100.20 13.060.70	Н09	ТН ВЭД 220100000 220110000	MOD

Ключевые слова: питьевая вода, *Escherichia coli*, колиформные бактерии, метод мембранной фильтрации

Редактор *Д.М. Кульчицкий*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *Ю.В. Демениной*

Сдано в набор 24.12.2013. Подписано в печать 22.01.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,80. Тираж 153 экз. Зак. 102.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru