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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34786— 2021

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2021

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 22 октября 2021 г. № 144-П)

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	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 ноября 2021 г. № 1422-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34786—2021 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2022 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2021

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 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды 3
5 Подготовка к анализу 4
6 Отбор проб 6
7 Методы определения общего микробного числа 6
8 Экспресс-методы определения общего числа микробных клеток при их прямом микроскопическом подсчете 9
9 Методы определения колиформных бактерий, общих колиформных бактерий, бактерий группы кишечной палочки, обобщенных колиформных бактерий, термотолерантных колиформных бактерий и E.coli 11
10 Методы определения энтерококков в воде 17
11 Методы определения Pseudomonas aeruginosa 19
12 Методы определения колиформных бактерий, E.coli, энтерококков и Pseudomonas aeruginosa в питьевой воде с использованием тест-наборов Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert или тест-наборов с аналогичными характеристиками 20
13 Контрольные (референтные) штаммы микроорганизмов 25
Приложение А (обязательное) Постановка оксидазного теста и определение грам-принадлежности для подтверждения наличия в пробе воды колиформных бактерий 26
Приложение Б (обязательное) Определение наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов в 100 $см^3$ воды с помощью тест-системы Quanti-Tray (51 лунка) или тест-системы с аналогичными характеристиками 27
Приложение В (обязательное) Оценка повторяемости, воспроизводимости и достоверности при оценке различия средних значений с использованием критерия Стьюдента-Фишера 29
Библиография 31

МКС 67.160.01

Поправка к ГОСТ 34786—2021 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 3.3	**общее микробное число;** ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч, видимых с увеличением в два раза, и при температуре (22 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.	**общее микробное число;** ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, способных образовывать видимые при увеличении в два раза колонии на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С (при определении показателя «ОМЧ при 37 °С») в течение (24 ± 2) ч и при температуре (22 ± 2) °С (при определении показателя «ОМЧ при 22 °С») в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.
Пункт 3.7	Оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки,	Оксидазоотрицательные грамотрицательные, не образующие спор палочки,
	в течение (24 ± 3) ч	в течение (24 ± 2) ч
Пункт 3.11	факультативно анаэробных	факультативно-анаэробных
Пункт 9.1.4, первый абзац	в соответствии с А.4 (приложение А)	в соответствии с А.4 (приложение А) (допускается использовать тест Грегерсена)
Примечание	(44 ± 2) °С	(44 ± 0,5) °С
Подраздел 10.2, третий абзац	не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.	Вынимают один пакет из упаковки, слегка постукивают, чтобы гранулы среды оказались на дне пакета, после чего надламывают его верхнюю часть, не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.
Пункт 11.1.3	в течение 2 ч	в течение 24 ч

(ИУС № 4 2022 г.)

МКС 67.160.01

Поправка к ГОСТ 34786—2021 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 3.10	в течение 24—48 ч и	в течение 24—48 ч или
Раздел 4, первый абзац, первое перечисление	петрифильмы (Petrifilm) или	петрифильмы (Petrifilm), петритесты или
Подраздел 7.3, наименование	с использованием петрифильмов — тест-систем	с использованием тест-систем
Пункт 7.3.1	петрифильмы (Petrifilm) или	петрифильмы (Petrifilm), петритесты или
Пункт 7.3.2, четвертый абзац	петрифильм	петрифильм, петритест
Подраздел 9.6, первый абзац	Петрифильм тест-системы	Петрифильм, петритест — тест-системы
Подраздел 10.1. Пункт 10.1.2, восьмой абзац, перечисление в)	каплю свежеприготовленной 3 %-ной перекиси водорода	каплю 3 %-ной перекиси водорода
Подраздел 11.1. Пункт 11.1.7. Примечание	Среду Бонде	Среду Бонде (pH = 7,0 – 7,4)
	0,28 г фосфата натрия,	0,28 г фосфата натрия трехзамещенного или лимоннокислого натрия трехзамещенного,
Примечание, последний абзац	—	Срок хранения не более 1 месяца, возможно приготовление данной среды из кристаллогидратов с пересчетом на основное вещество.
Библиографические данные	ОКС 67.160.01	МКС 67.160.01

(ИУС № 10 2025 г.)

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

Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

Drinking water.
Methods for determining the total number of microorganisms, coliform bacteria, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Enterococcus

Дата введения — 2022—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на воду централизованного и нецентрализованного питьевого, в том числе горячего, водоснабжения, бассейнов и аквапарков (кроме бассейнов, используемых в бальнеологических целях), упакованную питьевую воду, включая природную минеральную, а также воду для использования в процессах производства алкогольной продукции, и устанавливает методы, в том числе ускоренные, для лабораторного контроля качества воды, используемой для питьевых целей, по показателям: общее число микробных клеток, общее микробное число (ОМЧ), колиформные бактерии, общие колиформные бактерии, термотолерантные колиформные бактерии, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококки.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 18963 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа

ГОСТ 24849 Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий

ГОСТ 30813 Вода и водоподготовка. Термины и определения

ГОСТ 31861* Вода. Общие требования к отбору проб

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

ГОСТ 31955.1 (ISO 9308-1:2000) Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет Escherichia coli и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ ISO 6222 Качество воды. Подсчет культивируемых микроорганизмов. Подсчет колоний при посеве в питательную агаризованную среду

ГОСТ ISO 7899-2 Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO 16266 Качество воды. Обнаружение и подсчет Pseudomonas aeruginosa. Метод мембранной фильтрации**

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 59024—2020.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 54755—2011 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa».

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 30813, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **ускоренные методы:** Методы, в том числе с использованием тест-систем, сокращающие время анализа по сравнению с общепринятыми методиками, но не снижающие точность выполнения испытаний и достоверность полученных результатов оценки качества питьевой воды по микробиологическим показателям.

3.2 **общее число микробных клеток:** Число микробных клеток, определяемых при увеличении более чем в тысячу раз при микроскопическом подсчете на мембранном фильтре после фильтрации воды.

3.3 **общее микробное число;** ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч, видимых с увеличением в два раза, и при температуре (22 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.

Примечание — Во исполнение требований [1] (пункт 2 таблицы 2 приложения № 2 и пункты 2 и 3 таблицы 2 приложения № 3) при определении показателя «ОМЧ при 37°С» используют температуру инкубации (37 ± 1) °С.

3.4 **Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa, синегнойная палочка):** Грамотрицательные, подвижные облигатно-аэробные, оксидазаположительные, не образующие спор палочки, распространенные в водной среде, участвующие в образовании биопленок на поверхностях конструкций систем водоснабжения.

Примечания

1 На питательных средах продуцируют характерные пигменты, используемые для последующей идентификации: пиоцианин (феназиновый пигмент, который окрашивает питательную среду в сине-зеленый цвет), пиовердин (желто-зеленый флуоресцирующий в ультрафиолетовых лучах пигмент), пиорубин — красного цвета.

2 P.aeruginosa способны длительно выживать в водной среде и устойчивы ко многим обеззараживающим агентам (по сравнению с колиформными бактериями), не требовательны в отношении питательных веществ и температуры размножения, размножаются и длительно выживают на внутренних поверхностях трубопроводов от 60 до 210 суток при температуре от 4 °С до 44 °С, образуют эндотоксины и другие активно действующие вещества (эластазу, коллагеназу), ввиду чего вызывают целый ряд различных заболеваний кожных покровов, верхних дыхательных путей, глаз и других слизистых, а также кишечные инфекции.

3.5 **колониеобразующая единица;** КОЕ: Показатель количества жизнеспособных микроорганизмов в единице объема воды.

3.6 **колиформные бактерии:** Лактозоположительные бактерии, являющиеся оксидазоотрицательными при испытаниях по стандартному тесту.

3.7 **общие колиформные бактерии:** Оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу (глюкозу) до кислоты и газа при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 3) ч и до 48 ч при отсутствии газа.

3.8 **обобщенные колиформные бактерии:** Оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, лактозоотрицательные и лактозо-

положительные, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 3) ч и до 48 ч при отсутствии газа.

3.9 **термотолерантные колиформные бактерии;** ТКБ: Бактерии, входящие в число общих колиформных бактерий, обладающие всеми их признаками и, кроме того, способные ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре (44 ± 0,5) °С в течение (24 ± 3) ч.

3.10 **бактерии группы кишечной палочки;** БГКП: Грамотрицательные палочки, представители семейства Enterobacteriaceae, не образующие спор, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при (36 ± 2) °С в течение 24—48 ч и сбраживающие глюкозу с образованием кислоты и газа при (36 ± 2) °С в течение (24 ± 3) ч и не обладающие оксидазной активностью.

3.11 **энтерококки:** Группа аэробных и факультативно анаэробных грамположительных бактерий, являющихся представителями резидентной микрофлоры человека и теплокровных животных, обладающих антигеном группы D, являющихся каталазонегативными, способными расти при (44,0 ± 0,5) °С на селективных средах, содержащих 0,04 % азида натрия и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ).

Примечание — К группе энтерококков (кишечных или фекальных энтерококков) относят Enterococcus faecalis с биоварами, Enterococcus faecium, Enterococcus durans и другие. Обнаружение их в воде, даже в отсутствие E.coli, указывает на фекальное загрязнение воды.

4 Средства измерений, аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды

Для проведения испытаний применяют аппаратуру, материалы, реактивы и питательные среды по ГОСТ 24849 со следующими дополнениями:

тест-системы с готовыми питательными средами на подложке петрифильмы (Petrifilm) или с аналогичными характеристиками;

Петрифильм-подобный Ридер (3M™ Petrifilm™ Plate Reader) или с аналогичными характеристиками;

фильтры мембранные с размером пор 0,15; 0,25; 0,45 мкм;

раствор карболового эритрозина;

аппарат для автоматизированного спирального посева при микробиологическом исследовании;

счетчики колоний;

карболовый эритрозин;

фуксин Циля;

фуксин Пфейффера;

фольга металлическая;

краситель Бисмарка коричневый (Bismarck Brown);

акридиновый оранжевый;

бриллиантовый зеленый;

1 %-ный водный раствор метиленового синего;

0,5 %-ный раствор красителя Бисмарк коричневый;

микроскоп с иммерсионным объективом 90Х или 100Х;

бумага фильтровальная;

среда с тергитолом 7;

агар хромогенный для колиформных бактерий (Chromocult Coliform Agar);

среда Readycult Coliforms 100;

среда Readycult Enterococci 100;

среда Сланец-Бартли;

бульон лактозный с борной кислотой;

среда лактозо-пептонная с индикатором;

агар энтерококковый Chromocult;

агар энтерококковый (азидный);

агар стрептококковый KF (KF Streptococcus Agar);

основа хромогенного агара для кишечных энтерококков (m-EI Chromogenic Agar Base);

агар желчно-эскулиновый с азидом натрия;

среда Бонде;

среда «Блеск»;

агар с цетримидом;
среда № 9 для выявления пигмента пиоцианина (ГРМ);
агар флюорогенный для псевдомонад;
кристаллический фиолетовый;
тест-наборы Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert или аналогичные;
система Quanti-Tray 51 или аналогичные;
система Quanti-Tray 2000 или аналогичные.

Примечание — Допускается использовать оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды, в том числе готовые и хромогенные среды, диагностические препараты и тест-системы по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте или с аналогичными характеристиками, разрешенными к применению для контроля питьевой воды в установленном порядке.

5 Подготовка к анализу

5.1 Посуда, применяемая для микробиологического анализа (пробирки, колбы, флаконы), должна проходить соответствующую подготовку, гарантирующую ее чистоту и стерильность. Стерилизованная посуда должна иметь маркировку с указанием даты стерилизации для последующего учета срока хранения.

Срок хранения стерильной посуды многоразового использования — не более 10 дней.

5.2 Перед стерилизацией посуда для микробиологического анализа должна быть тщательно вымыта и высушена. Посуду стерилизуют в сушильном шкафу сухим жаром одним из способов:

- при температуре (180 ± 3) °С — в течение 1 ч с момента достижения указанной температуры;
- при температуре (160 ± 5) °С — в течение 2,5 ч с момента достижения указанной температуры.

5.3 Материалы и лабораторную посуду, разрушающиеся при температуре от 160 °С до 180 °С (резина и т. п.), следует стерилизовать в паровом стерилизаторе при температуре (121 ± 3) °С в течение 20 мин.

После окончания анализа использованную лабораторную посуду с содержимым обеззараживают автоклавированием при температуре (126 ± 2) °С и давлении 0,15 МПа в течение 60 мин или (132 ± 2) °С и давлении 0,2 МПа в течение 20 мин с момента достижения указанной температуры; при росте споровой микрофлоры — при температуре (132 ± 2) °С и давлении 0,2 МПа в течение 90 мин с момента достижения указанной температуры.

5.4 Мойку лабораторной посуды после обеззараживания проводят с использованием моющих средств, не содержащих фосфаты, и тщательно промывают проточной водопроводной водой (не менее 10 раз), ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и стерилизуют.

5.5 Для определения качества удаления синтетических моющих и моюще-дезинфицирующих средств используют индикаторную бумагу с шагом измерительного диапазона не более 0,3 ед. pH. Предварительно определяют pH воды, применяемой для ополаскивания посуды на конечном этапе. Контрольные измерения pH проводят путем прикладывания индикаторной бумаги к поверхности вымытого мокрого стекла, прошедшего обработку. Для контроля произвольно выбирают три — десять единиц посуды. Значение pH воды, полученной в результате контроля, должно соответствовать pH дистиллированной воды, примененной для ополаскивания.

5.6 Использованные пипетки многоразового применения погружают в рабочий раствор дезинфицирующего средства, разрешенного к применению, и выдерживают определенное время в соответствии с инструкцией. После обеззараживания пипетки тщательно промывают проточной водопроводной водой до полного удаления дезинфицирующего средства, после чего два-три раза промывают дистиллированной водой и высушивают. Возможны альтернативные методы обеззараживания пипеток, например автоклавированием.

5.7 После высушивания чашки Петри, пробирки, пипетки укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу или металлическую фольгу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации.

Утилизацию посуды одноразового применения и использованных тест-систем проводят в соответствии с требованиями к обращению с медицинскими отходами.

5.8 Подготовка мембранных фильтров

5.8.1 Подготовку мембранных фильтров проводят в соответствии с рекомендациями производителя. Если производитель поставляет нестерильные фильтры, то до начала анализа фильтры помещают в емкость (из нейтрального материала) с небольшим количеством дистиллированной воды, нагревают, не допуская закипания, накладывая на поверхность воды по одному мембранному фильтру. Затем кипятят на очень слабом огне в течение 7 мин, не допуская бурного кипения, сливая после каждого кипячения воду. Процедуру замены воды повторяют три раза, после последнего кипячения воду не сливают. Простерилизованные фильтры используют непосредственно после стерилизации. Допускается их хранение после высушивания в асептических условиях. Перед употреблением проводят однократно процедуру стерилизации кипячением в дистиллированной воде.

5.8.2 Перед началом исследований мембранные фильтры проверяют визуально на отсутствие трещин, отверстий и др. дефектов.

5.9 Подготовка аппарата для фильтрования и фильтрация

5.9.1 Перед посевом воды фильтровальный аппарат обтирают ватным тампоном, смоченным 96 %-ным этиловым спиртом, и стерилизуют фламбированием. После сгорания спирта и последующего охлаждения на нижнюю часть фильтровального аппарата (столик) кладут фламбированным пинцетом стерильный мембранный фильтр, прижимают его фильтровальной воронкой или стаканом и закрепляют одним из способов, предусмотренных конструкцией фильтрующего устройства.

5.9.2 В воронку аппарата при соблюдении правил стерильности наливают отмеренный объем воды, создают разрежение и отфильтровывают содержимое воронки.

Чтобы обеспечить равномерное распределение бактерий на поверхности фильтра, при фильтровании 1 $см^3$ пробы воды в воронку сначала наливают (15 ± 5) $см^3$ (в зависимости от используемого диаметра фильтра) стерильной водопроводной воды, а затем вносят анализируемую воду.

При посеве нескольких объемов из одной пробы воды фильтрование проводят через один аппарат без повторной стерилизации фламбированием. Сначала фильтруют меньшие, а затем большие объемы воды, используя для каждого объема отдельный фильтр. Перед фильтрованием новой пробы воды аппарат стерилизуют фламбированием.

5.9.3 По окончании фильтрования и осушения фильтра отключают вакуум, воронку снимают, фильтр осторожно поднимают за край фламбированным пинцетом и переносят его, не переворачивая, на питательную среду, разлитую в чашки Петри, добиваясь отсутствия пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева. На одну чашку допускается помещать от двух до четырех фильтров (в зависимости от диаметра фильтров и чашки Петри) с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

5.10 Приготовление питательных сред и реактивов

5.10.1 Приготовление питательных сред и реактивов проводят по ГОСТ 31955.1, ГОСТ ISO 11133, ГОСТ ISO 7899-2, а также в соответствии с инструкциями производителя.

Питательные среды, которые в соответствии с указанием производителя не требуют стерилизации автоклавированием, а также среды с коротким сроком хранения после розлива в чашки Петри, могут быть приготовлены непосредственно перед анализом. Такие среды готовят в эмалированной или стеклянной емкости, или емкости из нержавеющей стали.

При использовании промышленных сухих питательных сред их готовят в соответствии с указаниями изготовителя. В этом случае следует соблюдать способ применения и срок хранения питательных сред, указанных на упаковках.

Питательные среды, разлитые в чашки и хранящиеся в холодильнике, перед посевом должны быть прогреты до комнатной температуры.

При наличии следов влаги на поверхности агаризованных сред проводят подсушивание в термостате, приоткрывая крышку, до исчезновения конденсата.

5.10.2 Подготовленные заранее стерильные емкости, питательные среды, лабораторную посуду и реактивы следует хранить в условиях, предусмотренных для каждого средства, среды и реактива с соблюдением стерильности и предельных сроков хранения. При этом емкости и пробирки с готовыми средами должны быть закрыты силиконовыми пробками и защищены колпачками из силикона или жароустойчивой бумаги или металлической фольгой. Чашки Петри с готовыми средами должны быть

помещены в специальные пакеты или завернуты в плотную бумагу, защищающую среду от высыхания и воздействия света.

При вскрытии упаковок и емкостей, удалении пробок (крышек) непосредственно перед проведением анализа, пробка (крышка) и края емкости не должны касаться посторонних поверхностей.

5.10.3 Операции по подготовке и проведению анализа выполняют чистыми и продезинфицированными руками (например, после обработки рук 70 %-ным этиловым спиртом или дезинфицирующими салфетками для индивидуального пользования) или в стерильных перчатках.

5.11 Приготовление разведений пробы воды

Для приготовления разведений анализируемой воды используют стерильные растворы для разведения: солевой (физиологический раствор, пептонный раствор или пептонно-солевой раствор).

При посеве проб воды объемом менее 0,1 и 1,0 $см^3$ используют разведения (1:9 и более) анализируемой воды. Для этого в пробирку с 9 $см^3$ раствора для разведения вносят 1 $см^3$ анализируемой воды. Пипетка не должна касаться поверхности раствора, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны. Другой стерильной пипеткой содержимое пробирки тщательно перемешивают многократным пипетированием или используя альтернативные методы (например, ротационные миксеры, вортексы), получая десятикратное разведение. Посев в питательную среду 1 $см^3$ этого разведения будет соответствовать посеву 0,1 $см^3$ анализируемой воды. При необходимости посева меньших объемов воды этой же пипеткой переносят 1 $см^3$ содержимого первой пробирки в следующую пробирку с 9 $см^3$ стерильного раствора. Посев 1 $см^3$ второго разведения будет соответствовать посеву 0,01 $см^3$ анализируемой воды.

6 Отбор проб

Отбор, транспортирование и хранение проб воды для микробиологического анализа проводят по ГОСТ 31861, ГОСТ 31942.

7 Методы определения общего микробного числа

7.1 Определение общего микробного числа при посеве в агаризированную среду

7.1.1 Сущность метода заключается в определении в 1 $см^3$ воды общего содержания мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать на питательном агаре колонии, видимые при увеличении в два раза после инкубации при температуре (36 ± 2) °С или при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ± 2 ч, а при отсутствии роста учет допустимо проводить через 48 ч и инкубации при температуре (22 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.

Примечание — Для оценки антропогенного микробного загрязнения, вторичного загрязнения, условий хранения воды определяют ОМЧ при (36 ± 2) °С и (22 ± 2) °С.

7.1.2 Перед проведением анализа каждую пробу воды тщательно перемешивают.

Питательный агар расплавляют, охлаждают до температуры 45 °С — 50 °С и помещают до использования в водяную баню при температуре (48 ± 1) °С для поддержания температурного режима питательного агара. Расплавленный агар используют в течение одного рабочего дня. Он не подлежит хранению и повторному расплавлению.

Пробы воды объемом по 1 $см^3$ засевают в две чашки Петри глубинным методом. При исследовании воды неизвестного качества возможно проведение дополнительного посева на две чашки по 1 $см^3$ из десятикратного разведения.

Примечание — Если визуально вода, поступившая на исследование, не соответствует органолептическим показателям цветности и мутности или рядом с местом отбора находится источник фекального загрязнения, пробы воды разводят в соответствии с 5.11 и засевают по чашке из каждого разведения.

7.1.3 С соблюдением правил асептики отбирают соответствующие объемы проб воды и вносят в стерильные чашки, слегка приоткрывая крышку.

После внесения исследуемой воды в чашки Петри ее заливают слоем питательного агара (для чашки Петри диаметром 90 мм заливают 8—12 мл расплавленного агара) при фламбировании краев емкости, в которой он содержался, так чтобы слой питательного агара был тонким и составлял 2—3 мм.

Воду быстро смешивают с агаром, осторожно наклоняя или вращая чашку по поверхности стола, исключая образования пузырьков воздуха и не покрытых агаром частей дна чашки, а также попадания агара на края и крышку чашки. После этого чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания питательного агара в течение 20 мин.

После застывания агара чашки переворачивают вверх дном, помещают в термостат не более чем по три-четыре чашки в стопке и инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч. При определении ОМЧ при 22 °С инкубацию проводят при температуре (22 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч.

7.1.4 После инкубации подсчитывают все выросшие на чашках колонии. При учете результатов оценивают все объемы посевов, в которых можно подсчитать количество выросших колоний. Чашки с ползучим ростом бактерий, распространившихся на всю поверхность чашки или на значительные зоны, маскирующие рост других колоний, исключают. Подсчитанное число колоний на каждой чашке суммируют, пересчитывают на объем воды, засеянный на эти чашки, к объему в 1 $см^3$. Подсчитывают среднеарифметическое число колоний, выросших на чашках, на которых вели учет, и делят на количество чашек, учитываемых при расчете среднеарифметического результата. Учету подлежат чашки, на которых наблюдается рост отдельных колоний.

Результат выражают либо дробным числом, либо целым числом КОЕ в 1 $см^3$. Для выдачи результата в виде целого числа полученный результат округляют в сторону увеличения.

Допускается представлять результат на основании подсчета колоний на одной чашке (с отметкой в протоколе анализа) в случаях, если на других чашках рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки.

В протоколе анализа результаты определения ОМЧ записывают следующим образом: «Число КОЕ/$см^3$» воды с указанием температуры инкубации посевов. Если рост колоний на чашках отсутствует, в протоколе исследований записывают: в графе определяемые показатели «ОМЧ», в графе единицы измерения в исследуемом объеме «КОЕ/$см^3$», в графе результаты «ноль».

Примечание — Если на всех чашках имеет место рост расплывчатых колоний, не распространившийся на всю поверхность, или выросло более 300 колоний и анализ повторить невозможно, если рост расплывчатых колоний распространился на всю поверхность чашки или подсчет невозможен из-за массивного роста, то подсчитывают сектор чашки с последующим пересчетом на всю поверхность и в протоколе исследования в графе результаты записывают «более 300 КОЕ/$см^3$», в этих случаях целесообразно повторить анализ воды. Результат может быть выражен в соответствии с требованиями документов, действующих на территории государства, принявшего настоящий стандарт.

Воспроизводимость результатов метода может быть достигнута при строгом соблюдении условий проведения анализа, а также при использовании питательного агара одинакового состава.

Примечание — Допускается проведение анализа в соответствии с ГОСТ ISO 6222.

7.2 Определение общего микробного числа с использованием мембранных фильтров

7.2.1 Сущность метода заключается в концентрировании микроорганизмов из определенного объема анализируемой воды на мембранном фильтре, выращивании их при (36 ± 2) °С на питательном агаре и подсчете количества микроорганизмов в 1 $см^3$ воды.

7.2.2 Фильтрацию выполняют с использованием прибора для фильтрования воды в соответствии с 5.9. Допускается проводить фильтрование путем помещения стерильного мембранного фильтра на подкладку из нескольких слоев фильтровальной бумаги в стерильные чашки Петри. Отмеренный объем воды при помощи пипетки постепенно и равномерно наносят на поверхность мембранного фильтра, фильтровальная бумага впитывает воду, прошедшую через мембранный фильтр.

7.2.3 Затем мембранный фильтр стерильным пинцетом перекладывают на чашку Петри с питательным агаром. Переворачивают чашку вверх дном и инкубируют посевы при (36 ± 2) °С в течение 24 ч. Для облегчения подсчета колоний и получения более точного результата используют реактив тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлорид для определения оксидазной активности.

После инкубации посевов мембранные фильтры переносят на фильтровальную бумагу, смоченную оксидазным реактивом. Колонии бактерий, обладающих оксидазной активностью, окрашиваются в яркий сине-фиолетовый цвет. При этом даже самые мелкие колонии хорошо видны на фоне светлого фильтра. Эта группа представлена бактериями рода Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio — активные участники самоочищения воды водоемов. Оксидазоотрицательные бактерии также хорошо различимы

на фоне слегка посиневшего фильтра. Метод позволяет всего за 1—5 мин дать качественную и количественную характеристику различных групп сапрофитных бактерий.

7.2.4 Учитывают общее число выросших колоний с последующим пересчетом на 1 $см^3$ анализируемой воды. Результат выражают числом КОЕ в 1 $см^3$ воды.

7.3 Определение общего микробного числа с использованием петрифильмов — тест-систем с готовыми питательными средами на подложке

7.3.1 Для реализации метода используются тест-системы с готовыми сухими питательными средами на подложке петрифильмы (Petrifilm) или с аналогичными характеристиками (далее тест-системы), содержащие готовую питательную среду и гель, растворимый в холодной воде, который застывает при комнатной температуре. На поверхность наносят сетку, которая облегчает подсчет колоний. До момента посева пробы тест-система не активна и может храниться длительное время. Для сохранения стерильности компоненты питательной среды покрывают сверху непроницаемой пленкой.

7.3.2 Тест-системы готовят к анализу в соответствии с инструкцией производителя с соблюдением правил стерильности.

Тест-системы помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку и в центр подложки (в месте нанесения геля) на поверхность тест-системы вносят 1 или 5 $см^3$ пробы воды или соответствующего разведения, после чего аккуратно опускают верхнюю пленку.

В центр тест-системы выемкой вниз помещают пластиковый распределитель и надавливают на центр распределителя для равномерного распределения пробы. Не допускается перемещать или крутить распределитель по тест-системе.

Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1—2 мин для затвердевания геля.

7.3.3 Затем посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

При инкубировании допускается размещать тест-системы стопкой по 20 шт.

7.3.4 Количество колоний на тест-системы подсчитывают визуально или автоматически с помощью Петрифильм-подобного Ридера или аналога.

Для подсчета отбирают тест-системы, на которых число колоний можно подсчитать визуально.

Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают число микроорганизмов в 1 $см^3$ пробы.

При большом количестве колоний на тест-системе может наблюдаться окрашивание всей зоны роста в красный или розовый цвет. Иногда на тест-системах с очень большим количеством колоний в центре может не оказаться видимых колоний, а по краям будет видно множество мелких колоний. В этих случаях результат не учитывается.

Некоторые бактерии могут разжижать гель, что затрудняет подсчет колоний; в этом случае необходимо подсчитывать количество колоний только на неизмененных участках тест-систем.

7.4 Автоматизированный метод посева проб воды или разведений бактериальных культур с аппарата для автоматизированного спирального посева при микробиологическом исследовании

7.4.1 Спиральный метод автоматизированного посева проб основан на распределении точно откалиброванной по объему анализируемой пробы на вращающиеся чашки Петри с агаром по логарифмически убывающей спирали Архимеда.

Способ посева, объем засеваемой пробы и количество последовательных посевов программируются вручную.

7.4.2 Для автоматизированного посева проб используют чашки Петри различного диаметра: 60, 90, 100 мм, в которые разливают питательный агар, предварительно приготовленный из сухого препарата и охлажденный до температуры 50 °С. Перед посевом чашки с агаром комнатной температуры не должны содержать капли влаги на поверхности.

Объем посева: 10, 100, 1000 мкл пробы воды.

Программируемый объем распределения: от 10 до 1000 мкл.

Возможен последовательный посев одного и того же образца на 20 чашек Петри по 10 мкл.

7.4.3 От центра пластины к ее краям исследуемый образец воды распределяется специальным прикрепленным шприцем на поверхность вращающейся чашки Петри с агаром по логарифмически убывающей спирали Архимеда. Это приспособление наливает непрерывно уменьшающийся объем исследуемого образца воды так, что концентрация в центре и у края достигает соотношения 10 000:1.

Распределяемый объем уменьшается по мере нанесения культуры от центра к краю чашки таким образом, чтобы существовала обратно пропорциональная зависимость между радиусом спирали и нанесенным объемом клеточной суспензии. Объем культуры точно откалиброван и известен в каждой точке чашки Петри.

Концентрацию образца определяют путем деления количества выросших после инкубации колоний на объем, распределенный в одном и том же секторе чашки.

7.4.4 Посевы инкубируют в термостате при температуре (36 ± 2) °С в течение 24 ч.

Интервал подсчета выросших колоний — до 1×10^{12} КОЕ/см^3.

Подсчет колоний на плотных питательных средах осуществляют вручную или с помощью автоматизированных счетчиков колоний.

7.5 Автоматизированный метод подсчета колоний на плотной питательной среде

При использовании ручного счетчика колоний подсчитывают от 0 до 2000 КОЕ на чашках Петри диаметром 60, 90, 100 мм, в том числе с технологией «темное поле».

При использовании автоматических счетчиков колоний минимальный размер подсчитываемых колоний составляет 0,05 мм.

При использовании автоматических счетчиков колоний с самым большим разрешением проводят сканирование 100 % поверхности чашки при скорости подсчета колоний 1000 КОЕ/с с использованием ультравысокого разрешения.

Происходит автоматическое разделение слипшихся колоний, а также выполняется детекция и подсчет колоний семи цветов на одной чашке, что важно при посеве на хромогенные среды. Возможен подсчет колоний на мембранных фильтрах и питательных подложках.

8 Экспресс-методы определения общего числа микробных клеток при их прямом микроскопическом подсчете

8.1 Метод Разумова

8.1.1 Сущность метода заключается в концентрировании микроорганизмов из воды на мембранном фильтре, окрашивании их красителем непосредственно на фильтре, приготовлении препарата для микроскопирования и подсчитывании под микроскопом с помощью окулярного сетчатого микрометра в нескольких полях зрения на определенной площади препарата.

Метод применяют в экстренных случаях, когда необходимо срочно дать ответ о количественном содержании бактерий, например при авариях в системе водоснабжения и т. п.

8.1.2 Отмеренный объем исследуемой пробы воды фильтруют через мембранные фильтры с размером пор 0,15—0,25 мкм.

Примечание — Не рекомендуется использовать фильтры фирмы MILLIPOR (США) ввиду специфичности их волокнистой структуры, так как бактериальные клетки не оседают на поверхности фильтра, а «проваливаются» в его толщу, что делает невозможным их микроскопирование.

Фильтры с осевшими на них микроорганизмами помещают на фильтровальную бумагу в чашках Петри и высушивают на воздухе. Для ускорения процесса высушивания фильтры допускается помещать в термостат или слабо нагретый сушильный шкаф.

8.1.3 Высушенные фильтры накладывают нижней стороной на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную раствором карболового эритрозина, помещенную в чашку Петри, и закрывают крышкой.

Примечание — Раствор карболового эритрозина готовят следующим образом: 5 г эритрозина растворяют в 100 см^3 5 %-ного раствора фенола.

Для окрашивания фильтры выдерживают не менее 1 ч (в среднем время окрашивания составляет 3—5 ч). Для равномерного окрашивания клеток мембранный фильтр должен плотно прилегать к бумажному фильтру с эритрозином.

8.1.4 Затем мембранный фильтр отмывают от красителя, перекладывая его на фильтровальной бумаге, обильно смоченной дистиллированной водой, до тех пор, пока вода не перестанет окрашиваться. После последней промывки поверхность фильтра остается розовой (за счет окрашенных бактерий), а края его становятся бледно-розовыми.

После этого мембранный фильтр с окрашенными микроорганизмами высушивают на воздухе.

Примечания

1 Для более эффективного окрашивания бактерий на фильтре рекомендуется использовать фуксин Циля, разведенный в 600 раз дистиллированной водой.

2 Окончательное окрашивание рекомендуется проводить свежеприготовленным фуксином Пфейффера или 1 %-ным водным раствором метиленового синего, после чего отмытый фильтр докрашивают фуксином Пфейффера. Время докрашивания составляет от 5 мин до 1 ч. Эта модификация усиливает окраску клеточных элементов, увеличивает контрастность препарата, что значительно облегчает количественный учет бактерий на мембранном фильтре.

8.1.5 Готовят препарат для микроскопирования. Для этого на обезжиренное предметное стекло наносят каплю иммерсионного масла, помещают на него окрашенный мембранный фильтр с осевшими клетками микроорганизмов верхней стороной, а сверху наносят другую каплю иммерсионного масла и накрывают покровным стеклом, исключая пузырьки воздуха.

8.1.6 Готовый препарат микроскопируют с иммерсионным объективом при увеличении 90× или 100×, в окуляр вкладывают сетчатый микрометр 10×, разделенный на мелкие квадраты.

Микроорганизмы подсчитывают в 20 полях зрения (в каждом поле зрения в четырех маленьких квадратах, расположенных по диагонали).

В каждом квадрате для достоверного счета должно содержаться 10—30 клеток бактерий. Более плотное распределение бактерий недопустимо.

8.1.7 Общее количество микроорганизмов в 1 см^3 воды X вычисляют по формуле

$$X = S \cdot N \cdot 10^6 / S_1 \cdot V, \quad (1)$$

где S — фильтрующая площадь аппарата, мм^2;

N — среднее число микроорганизмов в одном квадрате;

S_1 — площадь квадрата окулярного сетчатого микрометра, мкм^2;

V — объем профильтрованной воды, см^3;

10^6 — коэффициент перевода в мкм (мм^2 в мкм^2).

Примечание — Отношение $S \cdot N \cdot 10^6 / S_1$ — постоянная величина для данного микроскопа, одного и того же фильтровального аппарата, при пользовании одинаковым окуляром, объективом и сеткой.

8.2 Метод фазово-контрастной микроскопии подсчета общего числа микробных клеток на мембранном фильтре

После фильтрации воды и последующего высушивания мембранного фильтра готовят препарат методом Разумова по 8.1.5 и подсчитывают бактерии под микроскопом с помощью фазового-контрастного устройства, используя зеленый светофильтр, благодаря которому получается поле зрения спокойного зеленого цвета.

Бактерии выглядят как черные точки или палочки различных размеров. Анализ занимает 15—20 мин. Данный метод ускоряет и упрощает анализ, исключая необходимость окраски бактерий.

8.3 Люминесцентный метод подсчета общего числа микробных клеток на мембранном фильтре

8.3.1 Люминесцентно-микроскопический метод позволяет через 30 мин получить ответ о количественном содержании в воде как общего числа бактериальных клеток, так и отдельно количества живых и мертвых бактерий.

8.3.2 Для проведения анализа используют нелюминесцирующие мембранные фильтры.

С целью исключения люминесценции мембранных фильтров перед окрашиванием их освобождают от наполнителя путем кипячения в дистиллированной воде, сменяя воду до исчезновения специфического запаха.

Затем мембранные фильтры по одному опускают в горячий 0,5 %-ный раствор красителя Бисмарк коричневый и кипятят при помешивании в течение 30 мин.

По окончании окрашивания фильтры промывают под струей водопроводной воды, а избыток красителя из них удаляют путем кипячения фильтров в дистиллированной воде при периодической смене ее до тех пор, пока сливаемая вода не станет бесцветной.

Готовые фильтры высушивают на фильтровальной бумаге и хранят в черной фотографической бумаге.

8.3.3 Перед фильтрованием исследуемых проб воды мембранные фильтры, подготовленные по 8.3.2, смачивают в горячей дистиллированной воде. В воронку фильтровального аппарата сначала вносят 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, а затем анализируемую воду.

После фильтрации мембранный фильтр с осевшими на нем бактериями подсушивают на стерильной фильтровальной бумаге до полного высыхания.

8.4 Люминесцентный метод подсчета общего числа микробных клеток на мембранном фильтре с применением акридинового оранжевого

8.4.1 Сущность метода по 8.3 заключается в концентрировании микроорганизмов из воды на нелюминесцирующем мембранном фильтре, с последующим флуорохромированием акридиновым оранжевым, приготовлением препарата для микроскопирования и раздельного подсчета под люминесцентным микроскопом числа живых (зеленых) и мертвых (красных) клеток.

8.4.2 Через люминесцирующий мембранный фильтр фильтруют объем исследуемой воды, чтобы в одном квадрате сетчатого микрометра было 10—20 клеток.

После фильтрации мембранный фильтр, не высушивая, переносят на поверхность фильтровальной бумаги, смоченной раствором флуорохрома, осевшими бактериями вверх на 15—20 мин.

Примечание — В качестве раствора флуорохрома применяют акридиновый оранжевый. Раствор акридинового оранжевого готовят непосредственно перед определением на фосфатном буферном растворе (pH 6,0) в разведении 1:2000.

Затем фильтр отмывают от остатков флуорохрома перекладыванием на влажной фильтровальной бумаге до тех пор, пока площадка под фильтром не перестает окрашиваться, высушивают на воздухе или в термостате и готовят препарат для микроскопирования, используя нелюминесцирующее масло (например, парафиновое или вазелиновое).

После высушивания фильтр помещают на предметное стекло между слоями парафинового или вазелинового масла, накрывают покровным стеклом и осуществляют подсчет бактерий под люминесцентным микроскопом в падающем свете со светофильтрами СЗС-14, БС-8 и ФС-1, с запирающим светофильтром ЖС-18. Подсчитывают с помощью окулярного микрометра общее число бактерий, не менее чем в 20 квадратах, среди которых подсчитывают число зеленых (живых) и красных (мертвых) бактериальных клеток.

8.4.3 Для расчета используют формулу (1) (см. 8.1.7). Учитывая быстрое выцветание препарата, необходимо быстро проводить подсчет, а для подсчета каждого следующего квадрата обязательно передвигать препарат на еще не облученный участок.

8.4.4 При необходимости допускается высушенный фильтр после фильтрации воды хранить длительное время в черной бумаге.

9 Методы определения колиформных бактерий, общих колиформных бактерий, бактерий группы кишечной палочки, обобщенных колиформных бактерий, термотолерантных колиформных бактерий и E.coli

Колиформные, общие и обобщенные колиформные бактерии, БГКП, относятся к индикаторной группе бактерий, которая указывает на фекальное загрязнение воды и возможность присутствия возбудителей водоассоциированных бактериальных кишечных инфекций. В очищенной и дезинфицированной воде их обнаружение означает, что обработка была проведена некачественно или произошло вторичное микробное загрязнение.

9.1 Метод определения колиформных бактерий, общих и обобщенных колиформных бактерий, бактерий группы кишечной палочки и E.coli с использованием мембранных фильтров

9.1.1 При анализе питьевой воды системы централизованного водоснабжения высевают 300 $см^3$ воды (три объема по 100 $см^3$), пропуская этот объем не менее чем через два мембранных фильтра. При получении стабильных отрицательных результатов фильтрация 300 $см^3$ воды допустима через один

фильтр. При исследовании воды неизвестной степени бактериального загрязнения следует засевать несколько объемов, например, 10, 40, 100, 150 $см^3$ воды.

При исследовании питьевой воды нецентрализованного водоснабжения анализируют объем пробы воды не менее 100 $см^3$, пропуская через мембранные фильтры объемы 10 и 100 $см^3$, размещая от двух до четырех фильтров (в зависимости от диаметра фильтров и чашки Петри) на одной чашке Петри с дифференциальной средой с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

При исследовании упакованной питьевой воды, включая природную минеральную, а также воду для использования в алкогольной продукции, анализируют объем пробы воды 250 $см^3$, пропуская через мембранные фильтры объемы 50, 100 и 100 или 50 и 200 $см^3$, размещая от двух до четырех фильтров на одной чашке Петри с дифференциальной средой с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

При фильтровании воды неизвестного качества увеличивают количество фильтруемых объемов для получения изолированных колоний (например, выполняя посев по 1 $см^3$ из 1-го и 2-го десятикратных разведений). Фильтрующее устройство и мембранные фильтры стерилизуют по 5.8 и 5.9.

Следует начинать с фильтрования проб обеззараженной воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтровать загрязненные пробы.

При фильтровании объема исследуемой воды 1 $см^3$ необходимо в воронку предварительно налить не менее 10 $см^3$ стерильной водопроводной воды, а затем внести анализируемую воду с последующим созданием вакуума.

Если вода для исследования с повышенной мутностью, фильтрация больших объемов затруднена, то засевают объемы воды 0,1 $см^3$ и 0,1 $см^3$ из разведений засевают прямым посевом на чашки с дифференциально-диагностической средой с последующим растиранием посевов шпателем до полного впитывания влаги в среду.

9.1.2 После фильтрования анализируемой воды мембранные фильтры размещают посевом вверх на одну из селективных дифференциальных сред, например на среду Эндо, среду с тергитолом 7 или другие альтернативные селективные дифференциальные среды, разлитые в чашки Петри, добиваясь полного прилегания фильтров к толще среды, исключая образование пузырьков воздуха.

Примечание — Перед посевом чашки с селективными дифференциальными средами рекомендуется помещать на 10—15 мин в термостат при (44 ± 0,5) °С для прогревания и удаления с поверхности среды влаги.

Лактозный агар с тергитолом 7 используют вместо среды Эндо при исследовании воды с небольшим числом бактерий, при условии, что взвешенные вещества и фоновая микрофлора не оказывают отрицательного влияния на фильтрацию, культивирование и учет бактерий. Среда обладает низкой селективностью, поэтому она пригодна для обнаружения поврежденных и стрессированных клеток бактерий, в том числе с замедленной ферментацией лактозы.

На одну чашку с дифференциальной средой допускается помещать от двух до четырех фильтров (в зависимости от диаметра фильтров и чашки Петри) с условием, чтобы фильтры не соприкасались. Под каждым фильтром на дне чашки делают надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева. Чашки с посевами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 3) ч.

9.1.3 При отсутствии роста каких-либо колоний на фильтрах или при наличии только пленчатых, губчатых, с неровной поверхностью и краями, плесневых и других нехарактерных для колиформных бактерий колоний выдают отрицательный результат.

При обнаружении колоний, характерных для бактерий семейства Enterobacteriaceae (БГКП), колиформных, общих или обобщенных колиформных бактерий выполняют оксидазный тест путем наложения фильтра колониями вверх на кружок фильтровальной бумаги, обильно смоченный оксидазным реактивом, в соответствии с А.1 и А.2 (приложение А). При прямом посеве оксидазный тест выполняют в соответствии с А.3 (приложение А).

Колонии, изменившие цвет на синий или сине-фиолетовый, из учета исключают.

Если все колонии изменили цвет, выдают отрицательный ответ.

Среди колоний, не изменивших цвет, подсчитывают отдельно колонии каждого типа.

На среде Эндо подсчитывают типичные колонии: красные, темно-красные с металлическим блеском и без него, с отпечатком на обратной стороне фильтра (лактозоположительные), розовые разных оттенков (лактозоотрицательные).

По три-четыре колонии каждого типа пересевают в пробирки с полужидкой средой Гисса с глюкозой для подтверждения их принадлежности к колиформным, обобщенным или общим колиформным бактериям, бактериям семейства Enterobacteriaceae. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С

в течение (24 ± 3) ч. Первичный учет на подтверждающих полужидких средах возможен через 4—6 ч. При обнаружении кислоты и газа дают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты для окончательного учета пробирки с посевами оставляют в термостате до 48 ч.

На среде с тергитолом 7 подсчитывают типичные колонии с желто-оранжевой, кирпично-красной окраской, иногда с ржаво-окрашенным центром, образующим желтую окраску в среде под мембраной.

9.1.4 Если на фильтрах на дифференциально-диагностических средах выросли типичные лактозоположительные грамотрицательные, в соответствии с А.4 (приложение А) колонии с отрицательным оксидазным тестом, проведенным в соответствии с А.1 и А.2 (приложение А), их число суммируют, умножают на 100 и делят на профильтрованный объем. В протоколе анализа указывают количество колиформных и общих колиформных бактерий, выросших в 100 $см^3$ воды.

Для определения бактерий E.coli типичные колонии на среде Эндо (темно-красные с металлическим блеском и отпечатком) или желтые на среде с тергитолом 7 пересевают на среды с лактозой (в лактозный бульон с борной кислотой с ватой или поплавком для улавливания газа, лактозо-пептонную среду с поплавком) и немедленно помещают в термостат при (44 ± 0,5) °С. Среды перед посевом должны быть прогреты до температуры 44 °С — 45 °С. В качестве E.coli учитывают колонии, дающие помутнение и газообразование через (24 ± 2) ч инкубации посевов.

Примечание — Для приготовления лактозного бульона с борной кислотой в 1 л дистиллированной воды растворяют: 10 г пептона, 12,2 г калия фосфорнокислого двузамещенного (безводного), 4,1 г калия фосфорно-кислого однозамещенного (безводного), 3,2 г борной кислоты, 5 г лактозы. После растворения всех ингредиентов при нагревании среду остужают до комнатной температуры и разливают по 5 мл в пробирки с поплавками или комочками ваты, стерилизуют при (112 ± 2) °С 12 мин. Срок хранения — не более двух недель. Каждую новую партию борной кислоты следует испытывать. При выращивании E.coli при температуре (44 ± 2) °С среда дает положительную реакцию — помутнение и газ.

Если на фильтрах выросли лактозоотрицательные колонии с отрицательным оксидазным тестом, то такие колонии пересевают в полужидкую среду с глюкозой и инкубируют посевы при (36 ± 2) °С. Учет образования кислоты и газа проводят через 4—6 ч, при отсутствии газа пробирки оставляют в термостате до 24 ч для окончательного учета. Число бактерий, ферментирующих глюкозу до кислоты и газа, суммируют с числом лактозоположительных колоний, сумму делят на профильтрованный объем. В протоколе анализа указывают число обобщенных колиформных бактерий, БГКП, выросших в исследуемом объеме воды.

Если при выборочной проверке колоний одного типа получены неодинаковые результаты, то вычисляют число подтвержденных бактерий одного типа X по формуле

$$X = (a \cdot c)/b, \quad (2)$$

где a — общее число колоний этого типа;

b — число проверенных из них;

c — число колоний с положительным результатом.

Подсчитывают число подтвержденных колоний каждой группы отдельно. Подсчет ведут только на тех фильтрах, где обнаружены изолированные колонии. Результат подсчета на каждом фильтре суммируют и определяют число КОЕ в исследуемом объеме воды Y по формуле

$$Y = (a \cdot M)/V, \quad (3)$$

где Y — сумма подтвержденных колоний в исследованном объеме;

M — нормируемый объем воды;

V — объем воды, профильтрованный через фильтры, на которых проводили учет.

При получении дробного ответа в протоколе исследования рекомендуется результат округлять в большую сторону.

Анализ воды заканчивают через 18—24 ч.

Окончательный результат указывают в протоколе анализа: «Число КОЕ колиформных бактерий в исследуемом объеме» или «Число КОЕ наименование бактерий, определяемых в соответствии с 3.7—3.8 в исследуемом объеме» или «Число КОЕ БГКП в исследуемом объеме» или «Колиформные бактерии в исследуемом объеме не обнаружены» или «Наименование бактерий, определяемых в со-

ответствии с 3.7—3.8, в исследуемом объеме не обнаружены», или «БГКП в исследуемом объеме не обнаружены» и регистрируют в журнале испытаний.

В случаях сплошного роста на всех фильтрах и невозможности учета результатов анализа в протоколе записывают: «Сплошной рост» и анализ повторяют.

Примечание — При обнаружении оксидазоположительных колоний рекомендуется провести отсев подозрительных колоний для проведения дальнейшей идентификации и их принадлежности к P.aeruginosa.

Примеры

1 При посеве трех фильтров, через которые было профильтровано по 100 см^3 образца воды, при учете результатов обнаружено, что на одном фильтре выросло две колонии в 100 см^3, на остальных фильтрах рост не отмечен (отсутствует). Число бактерий рассчитывают следующим образом:

(2 · 100) : 300 = 0,7 КОЕ колиформных бактерий в 100 см^3.

При этом в протоколе исследования результат записывают, проводя округление до целых чисел в сторону увеличения: «1 КОЕ колиформных бактерий в 100 см^3» либо «0,7 КОЕ колиформных бактерий в 100 см^3».

2 При посеве 10, 40, 100, 150 см^3 на фильтрах с профильтрованным объемом 40 см^3 выросло четыре изолированных колонии, с профильтрованным объемом 100 см^3 — три колиформные бактерии. Фильтры с объемом 10 и 150 см^3 заросли и учету не подлежат. Суммируют общее число колоний на тех фильтрах, где получены изолированные колонии, и пересчитывают на объем 100 см^3:

(4 + 3) · 100 : (40 + 100) = 5 КОЕ в 100 см^3.

При этом в протоколе исследования результат записывают «5 КОЕ колиформных бактерий в 100 см^3».

9.2 Метод определения E.coli с использованием мембранных фильтров

Для обнаружения E.coli допускается проведение дополнительного посева исследуемой воды на фильтре объемом 100 см^3 на дифференциальные лактозные среды с дальнейшей инкубацией посева микроорганизмов при температуре (44 ± 0,5) °С.

Если на мембранном фильтре в течение 18—24 ч не обнаружен рост колоний или выросли нетипичные колонии, то в журнале испытаний регистрируют сведения об отсутствии E.coli в пробе воды.

При наличии выросших на мембранных фильтрах характерных темно-красных колоний с металлическим блеском и отпечатком проводят их дальнейшее подтверждение на принадлежность к бактериям E.coli в соответствии с 9.1.4.

Подтверждением наличия E.coli является помутнение и газообразование в среде лактоза с борной кислотой. Подтвержденные колонии подсчитывают.

Результат испытаний выражают числом КОЕ E.coli в 100 см^3 воды.

При фильтрации пробы объемом более 100 см^3 или нескольких объемов пробы воды на разных мембранных фильтрах результат испытаний вычисляют по 9.1.4.

При отсутствии на фильтрах роста характерных для E.coli колоний и отрицательной реакции на подтверждающих средах в протоколе испытаний записывают: «КОЕ в 100 см^3 воды не обнаружены».

При необходимости получения количественной оценки результата определения E.coli в анализируемой пробе воды подсчитывают сумму всех подтвержденных колоний в соответствии с 9.1.4.

Примечание — Допускается проведение анализа в соответствии с ГОСТ 31955.1.

9.3 Определение термотолерантных колиформных бактерий

Для определения термотолерантных колиформных бактерий работают с секторами среды Эндо, где выросли типичные лактозоположительные колонии. Делают посев двух-трех 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 ± 0,5) °С. Немедленно после посева пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 18—24 ч. Допускается просмотр посевов через 4—6 ч.

При росте на среде Эндо лактозоположительных бактерий и выявлении способности этих бактерий ферментировать лактозу до кислоты и газа в течение 18—24 ч при температуре (44 ± 0,5) °С дают положительный ответ на наличие в этом объеме пробы воды ТКБ.

Результат испытаний выражают числом КОЕ ТКБ в исследуемом объеме воды по 9.2.

При отсутствии на фильтрах роста ТКБ в протоколе испытаний записывают: «КОЕ ТКБ в исследуемом объеме воды не обнаружены».

9.4 Определение колиформных бактерий, общих колиформных бактерий, бактерий группы кишечной палочки и E.coli методом мембранной фильтрации с использованием хромогенных питательных сред

Определение колиформных бактерий и E.coli в пробе анализируемой воды проводят с использованием мембранной фильтрации, применяя в качестве питательной среды одну из хромогенных сред (например, Chromocult Coliform Agar или аналога).

После фильтрации пробы воды фильтр помещают на поверхность хромогенной среды.

Инкубацию посевов проводят при температуре (36 ± 2) °С в течение 21—24 ч.

По истечении времени инкубации посевов, с учетом результата оксидазного теста, подсчитывают количество окрашенных колоний, выросших на фильтре, характерных для колиформных бактерий: колонии от красного цвета до оранжевого, бесцветные, розовые (реакция с Salmon-GAL), включая E.coli: от темно-синего до фиолетового цвета (реакция с Salmon-GAL и X-глюкуронидом). Мелкие колонии не учитывают.

Обработку и оформление результатов проводят по формуле (3) в соответствии с 9.1.4.

9.5 Определение E.coli методом мембранной фильтрации с использованием среды с желчью.

Для определения E.coli используют две среды: триптон-желчный агар (ТЖА) и триптон-соевый агар (ТСА).

Фильтрование отмеренных объемов воды проводят по 5.9.

После фильтрования отмеренных объемов воды мембранные фильтры с посевами помещают на ТСА и инкубируют в термостате при температуре (36 ± 2) °С в течение 4—5 ч.

Затем фильтры переносят на ТЖА и продолжают инкубацию посевов при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 19—20 ч.

После инкубации посевов учитывают наличие или отсутствие на фильтрах роста колоний.

При росте на фильтрах изолированных колоний белого, палевого, кремового цвета мембранный фильтр помещают на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для индольного теста (реактив Ковача) и облучают ультрафиолетовой лампой в течение 10—30 мин в зависимости от скорости окрашивания.

Все колонии микроорганизмов красного цвета на мембранном фильтре учитывают как колонии E.coli и подсчитывают их число.

Использование реактива Ковача на водной основе (для ускоренного индольного теста) дает более четкие и быстрые результаты без применения ультрафиолетового облучения.

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.

Обработку результатов проводят по 9.1.1 аналогично обработке результатов по определению колиформных бактерий.

Результат испытаний выражают числом КОЕ бактерий E.coli в 100 $см^3$ анализируемой пробы воды.

При отсутствии роста колоний E.coli на фильтрах или наличии отрицательной реакции на образование индола (отсутствие изменения цвета колоний) в протоколе испытаний записывают: «E.coli КОЕ/100 $см^3$ воды не обнаружены».

9.6 Метод определения колиформных бактерий и E.coli с использованием тест-систем с готовыми питательными средами на подложке

Петрифильм тест-системы с готовыми питательными средами на подложке или с аналогичными характеристиками (далее — тест-системы) для определения колиформных бактерий и E.coli готовят к анализу в соответствии с инструкцией производителя с соблюдением правил стерильности.

Сначала проводят фильтрацию проб воды с помощью мембранных фильтров по 5.9.

После фильтрации фильтры стерильным пинцетом помещают на подложку. Посевы инкубируют в термостате при температуре (36 ± 2) °С в течение 18—24 ч.

Колиформные бактерии в зависимости от использованной тест-системы определяют по следующим признакам: характерному цвету колоний, изменению цвета среды вокруг колоний. Наличие газообразования под пленкой тест-систем также подтверждает присутствие в пробе воды колиформных бактерий.

Для определения E.coli при использовании тест-систем одновременно с ростом бактерий учитывают газообразование и характерную окраску колоний, что исключает дополнительный этап их идентификации.

Расчет и оформление результатов проводят по формуле (2) в соответствии с 9.1.4.

9.7 Метод определения колиформных бактерий и бактерий E.coli с использованием среды Readycult Coliforms 100 или с аналогичными характеристиками (качественный метод)

9.7.1 Анализ с использованием среды Readycult Coliforms 100 или с аналогичными характеристиками (селективная питательная среда для определения наличия/отсутствия колиформных бактерий и E.coli в 100 $см^3$ воды) проводят в соответствии с инструкцией производителя.

При хранении проб воды при температуре ниже 25 °С исследование следует начать не позднее чем через 6 ч после отбора проб. Пробы воды хранят не более 24 ч в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С, при этом посев начинают после нагревания пробы до комнатной температуры, но не позднее чем через 6 ч.

В стерильный прозрачный флакон вместимостью 250 $см^3$ с завинчивающейся крышкой помещают 100 $см^3$ образца воды.

Вынимают один пакет из упаковки, слегка постучав, чтобы гранулы среды оказались на дне пакета, после чего надламывают его верхнюю часть, не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.

Содержимое пакета добавляют во флакон к образцу воды. Закрывают флакон и перемешивают до полного растворения гранулированной среды.

Посевы инкубируют в течение 18—24 ч при температуре (36 ± 2) °С.

После инкубации посевов проводят учет результатов:

- колиформные бактерии и E.coli отсутствуют, если цвет среды не изменился или отмечено помутнение без изменения цвета среды;

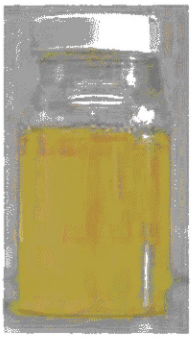
- бактерии обнаружены, если среда приобрела зелено-голубой цвет во всем объеме или верхнем слое. При перемешивании цвет среды не должен изменяться.

Для подтверждения наличия E.coli в емкостях, в которых отмечено изменение цвета среды, вносят 2,5 $см^3$ реактива Ковача. Красное кольцо на поверхности среды подтверждает образование индола, что свидетельствует о наличии E.coli в исследуемой пробе воды. Наличие E.coli допускается подтверждать также по свечению содержимого емкости в УФ-свете при использовании УФ-лампы (при наличии флуорогенного субстрата в составе среды).

Изменение цвета среды Readycult Coliforms 100 или с аналогичными характеристиками при определении наличия/отсутствия колиформных бактерий и E.coli в 100 $см^3$ воды представлено на рисунке 1 и в таблице 1.



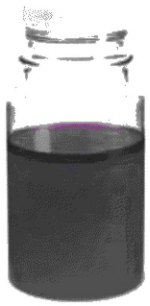
а) Контрастное изменение цвета среды – колиформы обнаружены



б) Цвет среды не изменился – отрицательный результат – колиформы и E.coli отсутствуют



в) Наличие свечения (флюоресценция) в УФ-свете – E.coli обнаружены



г) Вишнево-красное кольцо (положительный тест на индол) – E.coli обнаружены

Рисунок 1 — Изменение цвета среды Readycult Coliforms 100 или с аналогичными характеристиками при определении наличия/отсутствия колиформных бактерий и E.coli в 100 см^3 воды

Таблица 1 — Признаки наличия/отсутствия колиформных бактерий и E.coli при использовании среды Readycult Coliforms 100 или с аналогичными характеристиками

Наличие/отсутствие показателя	Изменение цвета среды на сине-зеленый (наличие/отсутствие)	Флюоресценция	Индольный тест
Наличие колиформных бактерий	+	–	–
Наличие E.coli	+	+	+
Отсутствие E.coli и колиформных бактерий	Светло-желтый	–	–
Примечание — «+» — положительный результат; «–» — отрицательный результат.			

9.7.2 При изменении цвета среды в протокол учета результатов записывают: «колиформные бактерии обнаружены в 100 см^3 воды», при изменении цвета среды и флюоресценции: «E.coli обнаружены в 100 см^3 воды», если цвет среды не изменился: «колиформные бактерии в 100 см^3 в воде не обнаружены» или и «E.coli в 100 см^3 воды не обнаружены».

Примечание — Применение аналогичных сред для определения колиформных бактерий и бактерий E.coli необходимо только в соответствии с инструкцией производителя к ним.

10 Методы определения энтерококков в воде

10.1 Метод определения энтерококков с использованием мембранных фильтров

10.1.1 Отмеренный объем исследуемой воды (100 см^3) фильтруют через мембранные фильтры с соблюдением требований 5.8 и 5.9. Упакованную питьевую воду, включая природную минеральную, а также воду для использования в алкогольной продукции фильтруют в объеме 250 см^3. При исследовании упакованной питьевой воды, включая природную минеральную, а также воду для использования в алкогольной продукции пробы воды фильтруют в объеме 250 см^3, пропуская через мембранные фильтры объемы 50, 100 и 100 см^3 или 50 и 200 см^3, размещая от двух до трех фильтров на одной чашке Петри с дифференциальной средой с условием, чтобы фильтры не соприкасались.

При исследовании воды неизвестного качества, если имеется предположение о внесенном загрязнении, дополнительно фильтруют 1 и 10 см^3 воды, чтобы получить рост изолированных колоний.

10.1.2 После фильтрации фильтры переносят, не переворачивая, на одну из дифференциально-диагностических сред (например, среду Сланец-Бартли, энтерококковый агар Chromocult, KF

Streptococcus Agar, селективную плотную питательную среду для выделения кишечных энтерококков, готовую к использованию, энтерококковый (азидный) агар, m-EI Chromogenic Agar Base, желчь-эскулин-азидный агар), добиваясь полного прилегания фильтра к среде без пузырьков воздуха.

Чашки с посевами помещают в термостат дном вверх и инкубируют в течение 24 ч при температуре (36 ± 2) °С.

При отсутствии роста колоний инкубацию посевов продолжают до 48 ч.

Для учета выбирают фильтры, на которых выросло до 50 колоний.

Подсчитывают колонии, характерные для кишечных энтерококков: выпуклые, с ровными краями, темно-малиновые (Enterococcus faecalis с биоварами) и розовые, светло-розовые, равномерно окрашенные или с темно-красным нечетко оформленным центром (Enterococcus faecium, Enterococcus durans и др.) в зависимости от используемой среды.

Очень мелкие (на пределе видимости невооруженным глазом), плоские разных оттенков, ярко-малиновые с четко выраженным центром и бесцветным ободком колонии не учитывают. Дифференциацию энтерококков от посторонней микрофлоры допускается проводить по морфологии колоний под бинокулярной лупой.

Информация о параметрах инкубации и характере роста колоний энтерококков, необходимая для учета результатов, приведена в таблице 2.

Таблица 2 — Параметры инкубации и характеристика колоний фекальных кишечных энтерококков на плотных питательных средах

Питательная среда	Инкубация посевов	Характер роста колоний кишечных энтерококков	Рост посторонних бактерий (не учитывают)
Среда Сланец-Бартли	При (36 ± 2) °С, 24—48 ч	Темно-малиновые выпуклые с ровными краями, равномерно окрашенные (Enterococcus faecalis). Розовые равномерно окрашенные или с темно-красным центром нечетко оформленным (Enterococcus faecium)	Мелкие, плоские, ярко-малиновые с четко выраженным центром и бесцветным ободком
Энтерококковый агар Chromocult	При (36 ± 2) °С, 24—48 ч	Красные, темно-бордовые, диаметром 0,5—2 мм и розовые	Бесцветные, сине-фиолетовые или бирюзовые колонии. Грамотрицательные бактерии не растут
KF стрептококковый агар (KF Streptococcus Agar)	При (36 ± 2) °С, 46—48 ч	Красные, розовые	Оранжевые, желтые, белые. Грамотрицательные бактерии ингибируются
Основа хромогенного агара для энтерококков (m-EI Chromogenic Agar Base)	При (41 ± 2) °С, 18—24 ч	Синие, при добавлении в среду ТТХ красные	Колонии другого цвета не учитывают

При необходимости подтверждения наличия в пробе воды энтерококков отбирают по две-три колонии каждого типа:

а) окрашивают по Граму и микроскопируют (Приложение А или см. ГОСТ 18963). При обнаружении в мазках грамположительных полиморфных, как правило, слегка вытянутых с заостренными концами диплококков, дают положительный ответ;

б) колонии пересевают секторами на солевой агар с ТТХ и инкубируют посевы в течение 24—48 ч при температуре (36 ± 2) °С. Энтерококки на среде дают равномерный нежный рост на протяжении всего штриха. Другие бактерии на этой подтверждающей среде не растут;

в) выполняют каталазный тест. Для этого петлей наносят каплю дистиллированной воды на предметное стекло, в которой растирают исследуемую культуру. После подсушивания на воздухе добавляют каплю свежеприготовленной 3 %-ной перекиси водорода. При отсутствии пузырьков газа считают тест каталазоотрицательным. В качестве контрольной каталазоположительной культуры используют любой вид стафилококков.

10.1.3 Для определения количества энтерококков в исследуемом объеме воды X подсчитывают число колоний кишечных энтерококков на фильтрах, где выросло менее 50 колоний, суммируют и вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{V}, \quad (4)$$

где a — число подсчитанных кишечных энтерококков в сумме;

V — объем воды, профильтрованной через фильтры, на которых проводили учет.

Результат испытаний выражают числом КОЕ энтерококков в исследуемом объеме воды.

В протоколе анализа также указывают особые обстоятельства, которые могли повлиять на результат (превышение срока хранения пробы, изменение температуры и времени инкубации посевов, отклонения от правил при учете результатов и т. д.).

При отсутствии роста колоний в протоколе анализа записывают: «КОЕ энтерококков в исследуемом объеме воды (например, 100 см^3 или 250 см^3) не обнаружено».

Примечание — Допускается проведение анализа в соответствии с ГОСТ ISO 7899-2.

10.2 Метод определения энтерококков с использованием среды Readycult Enterococci 100 или среды с аналогичными характеристиками (качественный метод)

Анализ с использованием среды Readycult Enterococci 100 или среды с аналогичными характеристиками (селективная питательная среда для определения наличия/отсутствия энтерококков и D-стрептококков в 100 см^3 воды) проводят в соответствии с инструкцией производителя.

В стерильный прозрачный флакон вместимостью 250 см^3 с завинчивающейся крышкой помещают 100 см^3 образца воды. При хранении проб воды ниже 25 °С, в том числе в холодильнике, пробы выдерживают до посева при комнатной температуре.

Вынимают один пакет из упаковки, слегка постукивают, чтобы гранулы среды оказались на дне пакета, после чего надламывают его верхнюю часть, не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.

Содержимое пакета добавляют во флакон к образцу воды. Закрывают флакон и перемешивают до полного растворения гранулированной среды.

Посевы инкубируют в течение 18—24 ч при температуре (36 ± 2) °С.

После инкубации посевов проводят учет результатов:

- бактерии энтерококков отсутствуют, если цвет среды не изменился или отмечено помутнение среды без изменения цвета;
- энтерококки обнаружены, если цвет среды изменился.

При перемешивании цвет среды не должен изменяться. Изменение цвета среды даже в верхней части флакона также подтверждает наличие кишечных энтерококков в пробе воды (реакция с хромогенным субстратом X-GLU).

11 Методы определения Pseudomonas aeruginosa

11.1 Метод определения Pseudomonas aeruginosa на средах Бонде и «Блеск»

11.1.1 Метод основан на определении наличия или отсутствия Pseudomonas aeruginosa в воде с использованием двух этапов анализа: накопление в жидкой питательной среде Бонде с последующим высевом на подтверждающую плотную среду «Блеск» или агар с цетримидом.

11.1.2 В 500 см^3 исследуемой воды добавляют 50 см^3 среды Бонде 10-кратной концентрации и 2,5 см^3 0,01 %-ного раствора кристаллического фиолетового.

В объем 250 см^3 добавляют 25 см^3 среды Бонде 10-кратной концентрации и 1,25 см^3 0,01 %-ного раствора кристаллического фиолетового.

11.1.3 Посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 2 ч. Если при просмотре посевов не отмечено каких-либо признаков роста, посевы оставляют в термостате для дальнейшей инкубации до 48 ч.

11.1.4 При обнаружении во флаконах помутнения среды и наличия на поверхности нежной пленки, как правило, поднимающейся по стенке флакона, не перемешивая, делают посев этой пленки пет-

лей на плотные подтверждающие среды (среда «Блеск» или агар с цетримидом) путем укола в толщу среды и растирания посева вокруг укола.

11.1.5 Посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 24 ч.

11.1.6 После инкубации посевов проводят учет результатов:

При наличии Pseudomonas aeruginosa на среде «Блеск» отмечается темно-малиновый, обильный рост колоний с блестящими вкраплениями и, как правило, ореолом просветления вокруг бляшки и, возможно, с запахом земляники.

На среде с цетримидом Pseudomonas aeruginosa растет в виде желтых, зеленовато-желтых, сине-зеленых колоний.

11.1.7 При характерном для Pseudomonas aeruginosa росте на подтверждающей среде в протоколе анализа записывают: «Pseudomonas aeruginosa обнаружены в исследуемом объеме (500 $см^3$ или 250 $см^3$) воды», при отсутствии роста: «Pseudomonas aeruginosa не обнаружены».

Примечание — Среду Бонде нормальной концентрации готовят растворяя в 100 $см^3$ 0,28 г фосфата натрия, 0,15 г фосфата натрий-аммония, 0,1 г однозамещенного фосфата калия, 0,02 г сульфат магния, размешивают до полного растворения и стерилизуют при 1 атм. в течение 20 мин. Непосредственно перед посевом добавляют 2,0 мл 0,01 %-ного водного раствора кристаллического фиолетового. При приготовлении концентрата среды Бонде все компоненты кроме воды добавляют в 10-кратном размере. Концентрат прибавляется к объекту в соотношении 1:10. Для приготовления селективно-дифференциальной среды «Блеск» в расплавленный МПА добавляют 0,3 г аргинина, 0,8 $см^3$ раствора ТТХ (самостерилизуется после хранения при комнатной температуре в течение 2—3 дней) и 10 $см^3$ стерильного снятого молока, размешивают и разливают в 6—7 чашек Петри. При отсутствии мясопептонного агара возможно применение упрощенного варианта среды «Блеск»: в 100,0 $см^3$ дистиллированной воды добавляют сухой питательный агар по прописи на этикетке, стерилизуют при 0,5 атм. в течение 15 мин и вносят 10,0 $см^3$ стерильного снятого молока и ТТХ 8,0 $см^3$ 10 %-ного водного раствора, смешивают и разливают в 6—7 чашек Петри. При необходимости подтверждения Pseudomonas aeruginosa выполняют дополнительные тесты для идентификации.

11.2 Метод определения Pseudomonas aeruginosa с использованием мембранных фильтров

Анализ проводят в соответствии с ГОСТ ISO 16266.

12 Методы определения колиформных бактерий, E.coli, энтерококков и Pseudomonas aeruginosa в питьевой воде с использованием тест-наборов Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert или тест-наборов с аналогичными характеристиками

Для качественного и количественного определения колиформных бактерий, E.coli, энтерококков и Pseudomonas aeruginosa используют тест-наборы Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert и тест-системы Quanti-Tray или тест-наборы с аналогичными характеристиками.

Анализ выполняют только с использованием нативной воды комнатной температуры.

При исследовании хлорированной воды во флаконы добавляют тиосульфат натрия из расчета 20 мг/л. Допускается использование стерильных одноразовых флаконов с тиосульфатом натрия. В пробах воды с чрезмерным содержанием хлора при добавлении реагентов тест-наборов может наблюдаться изменение окраски пробы, что означает негодность образца для анализа.

Не допускается предварительное обогащение пробы с использованием питательных сред, а также применение методов концентрации или растворения в ней каких-либо реагентов.

При учете результатов для сравнения используют отрицательный контроль с добавлением вместо пробы стерильной водопроводной воды с последующей инкубацией.

Для количественного определения в воде колиформных бактерий, E.coli, кишечных энтерококков и P.aeruginosa используют стерильные поддоны Quanti-Tray с 51-й лункой или с аналогичными характеристиками, по которым распределяется исследуемый образец воды с предварительно внесенной из блистера соответствующей каждому тест-набору средой, что позволяет определить от единичных до 200 клеток индикаторных бактерий в 100 $см^3$ исследуемого образца воды, даже при наличии в указанном объеме воды миллионов гетеротрофных бактерий.

Для качественной оценки результата используют стерильные, прозрачные, бесцветные, нефлюоресцирующие флаконы.

Допускается перед анализом прогреть образец воды, помещая флакон в водяную баню температурой (36 ± 2) °С на 20 мин или в водяную баню с температурой (44 ± 0,5) °С на 7—10 мин.

Для разведения используют только стерильную дистиллированную воду.

12.1 Методы определения колиформных бактерий и E.coli в питьевой воде с использованием тест-набора Colilert-18 или тест-набора с аналогичными характеристиками

12.1.1 Качественный метод для одновременного определения колиформных бактерий и E.coli

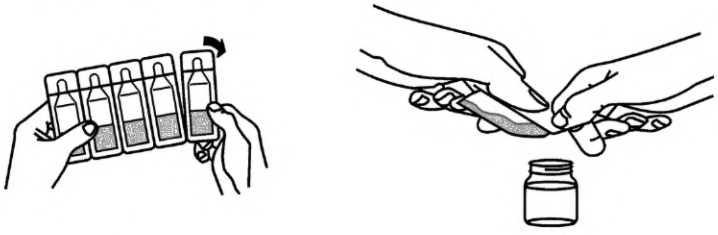
Метод позволяет одновременно обнаружить в воде как колиформные и термотолерантные бактерии, так и E.coli.

12.1.1.1 С соблюдением правил стерильности в стерильный, прозрачный, нефлуоресцирующий флакон отбирают пробу воды в объеме100 см^3.

Во флакон к 100 см^3 отобранной пробы воды добавляют содержимое одного блистера реагента Colilert-18 или с аналогичными характеристиками, надломив его верхнюю часть.

Схема внесения реагента в пробу воды представлена на рисунке 2.

После внесения реагента флакон закрывают стерильной пробкой и перемешивают до полного растворения, покачивая в течение 30—60 с.



а) б)

Рисунок 2 — Схема внесения реагента Colilert-18 в пробу воды

Примечание — При добавлении реагента Colilert-18 или аналогичного во флаконе с исследуемой пробой может происходить легкое (незначительное) изменение окраски воды.

12.1.1.2 Для определения колиформных бактерий посевы немедленно помещают в термостат и инкубируют в течение (18 ± 4) ч при температуре (36 ± 2) °С.

12.1.1.3 Для определения термотолерантных колиформных бактерий посевы немедленно помещают в термостат и инкубируют в течение (18 ± 4) ч при температуре (44 ± 0,5) °С.

12.1.1.4 После инкубации посевов проводят учет результатов, фиксируя флаконы с желтой окраской (см. таблицу 3).

Таблица 3 — Интерпретация результатов исследования питьевой воды с помощью тест-набора Colilert-18 и тест-системы Quanti-Tray или аналогичных

Цвет среды во флаконе (в лунках)	Результат
Менее желтый, чем в отрицательном контроле	Колиформные бактерии и E.coli не обнаружены
Желтый или интенсивно-желтый	Колиформные бактерии обнаружены
Желтый с положительной флуоресценцией	E.coli обнаружены

Отсутствие изменения цвета среды во флаконах указывает, что в исследуемом образце воды колиформные бактерии и E.coli не обнаружены.

Если образец воды имеет какой-то фоновый цвет, то необходимо сравнить цвет образца воды с растворенным реагентом Colilert-18 или с аналогичными характеристиками в такой же воде и отрицательным контролем (проинкубированная проба со стерильной дистиллированной водой, которая содержит соответствующий тестовый набор).

Изменение цвета среды на желтый подтверждает наличие колиформных бактерий в исследуемом образце воды и учитывается как положительный результат.

12.1.1.5 Флаконы с пробами, которые изменили цвет на желтый, проверяют на наличие флуоресценции, просматривая в ультрафиолетовом свете. Для просмотра в ультрафиолетовом свете используют УФ-лампу мощностью 6 Вт и длиной волны 365 нм. Образец рассматривают на расстоянии 12—15 см в темном помещении. Лампу держат обратной стороной к глазам лицом к образцу.

Флуоресценция среды указывает на наличие в исследуемом образце E.coli.

12.1.2 Определение наиболее вероятного числа колиформных бактерий и E.coli с помощью тест-системы Quanti-Tray и тест-набора Colilert-18 или тест-набора и тест-системы с аналогичными характеристиками

12.1.2.1 Во флакон со 100 $см^3$ исследуемой пробы воды вносят содержимое одного блистера реагента Colilert-18 или реагента с аналогичными характеристиками и перемешивают в соответствии с 12.1.1.1.

12.1.2.2 После полного растворения реагента Colilert-18 или аналогичного в исследуемой пробе воды содержимое флакона переливают согласно инструкции в промаркированный поддон с лунками Quanti-Tray 51 или поддон с аналогичными характеристиками и запаивают в герметизаторе Quanti-Tray Sealer PLUS или герметизаторе с аналогичными характеристиками (см. рисунок 3).

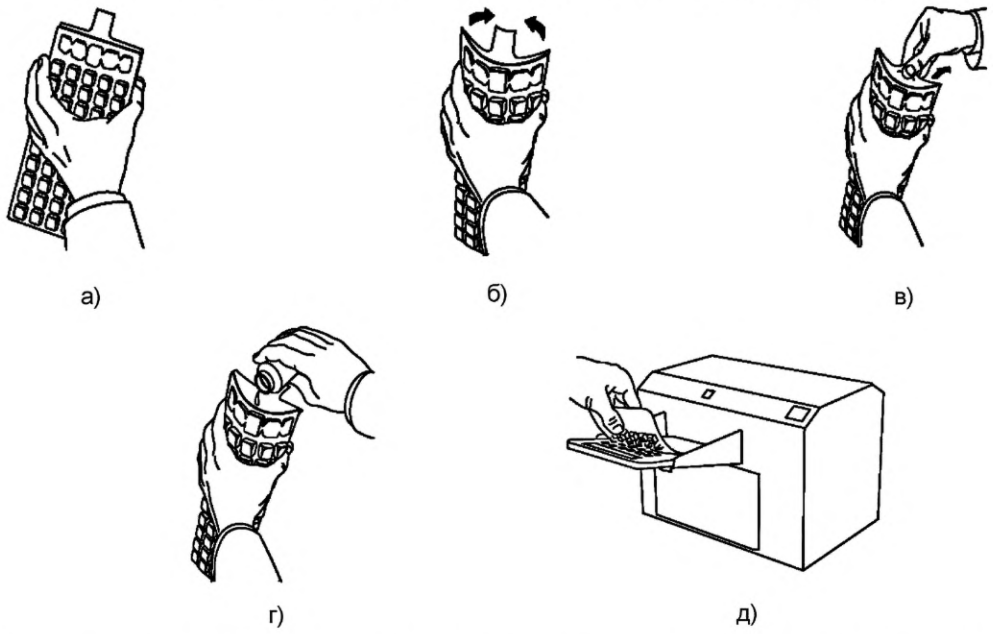


Рисунок 3 — Схема подготовки поддонов с лунками Quanti-Tray 51 или поддонов с аналогичными характеристиками для исследования воды с помощью тест-набора Colilert-18 или тест-набора с аналогичными характеристиками

12.1.2.3 Запаянные поддоны после герметизации высвобождают от резиновой подкладки, затем переворачивают и помещают в термостат для последующей инкубации в течение 18—22 ч при температуре (36 ± 2) °С.

12.1.2.4 Для определения термотолерантных колиформных бактерий посевы помещают в термостат и инкубируют в течение 18—22 ч при температуре (44 ± 0,5) °С.

12.1.2.5 После инкубации посевов проводят учет результатов, подсчитывая количество лунок в поддоне, изменивших цвет среды на желтый, и по таблице Б.1 (приложение Б) определяют наиболее вероятное число (НВЧ) колиформных бактерий.

Положительный результат для колиформных бактерий и E.coli учитывают через (18 ± 4) ч инкубации посевов, отрицательный — через 22 ч.

Интерпретацию результатов анализа питьевой воды с помощью тест-набора Colilert-18 проводят в соответствии с таблицей 3.

12.1.2.6 После подсчета лунок с желтой окраской, указывающих на наличие колиформных бактерий, поддон просматривают в ультрафиолетовом свете для выявления E.coli согласно 12.1.1.4. При наличии голубой флуоресценции подсчитывают количество положительных лунок с флуоресценцией и определяют НВЧ E.coli по таблице Б.1 (приложение Б).

12.1.2.7 Если при подсчете результатов все лунки тест-системы Quanti -Tray 51 изменили цвет на желтый, необходимо повторно провести анализ исследуемого образца воды или его десятикратного разведения с применением стерильной дистиллированной воды или использовать системы без первоначального разбавления Quanti-Tray 2000. В этом случае при подсчете результатов следует учитывать степень разведения, умножая НВЧ, найденное по таблице, на степень разведения. При посеве предварительно разведенных проб НВЧ, найденное по таблице, умножают на коэффициент разведения. При использовании тест-системы Quanti-Tray 2000 или тест-системы с аналогичными характеристиками результат учитывают по таблице, прилагаемой к тест-системе.

12.2 Методы определения энтерококков в питьевой воде с использованием тест-набора Enterolert-DW или тест-набора с аналогичными характеристиками

12.2.1 Качественный метод для определения энтерококков

12.2.1.1 Во флакон со 100 $см^3$ исследуемой пробы воды вносят содержимое одного блистера реагента Enterolert-DW или реагента с аналогичными характеристиками и перемешивают до полного растворения, аналогично 12.1.1.1.

12.2.1.2 Затем посевы помещают в термостат и инкубируют при температуре (41 ± 1) °С в течение 24—28 ч.

12.2.1.3 После инкубации посевов проводят учет результатов, отмечая наличие изменения цвета среды согласно таблице 4.

Таблица 4 — Интерпретация результатов исследования питьевой воды с помощью тест-набора Enterolert-DW или тест-набора с аналогичными характеристиками

Цвет среды во флаконе (в лунках)	Результат
Синий	Отрицательный — кишечные энтерококки не выявлены
Зеленый	Положительный — кишечные энтерококки обнаружены

12.2.2 Определение наиболее вероятного числа энтерококков с помощью тест-системы Quanti-Tray и тест-набора Enterolert-DW или тест-набора и тест-системы с аналогичными характеристиками

12.2.2.1 Во флакон со 100 $см^3$ исследуемой пробы воды вносят содержимое одного блистера реагента Enterolert-DW или реагента с аналогичными характеристиками и перемешивают до полного растворения, аналогично 12.1.1.1.

12.2.2.2 Содержимое флакона переливают в соответствии с инструкцией в промаркированные поддоны с лунками Quanti-Tray или поддоны с аналогичными характеристиками, после чего запаивают в герметизаторе Quanti-Tray Sealer PLUS или герметизаторе с аналогичными характеристиками по 12.1.2.2.

12.2.2.3 Герметично запаянные поддоны инкубируют в термостате при температуре (41 ± 1) °С в течение 24—28 ч. Если после 24 ч инкубации изменение цвета посевов не выявлено, то поддоны с посевами оставляют в термостате до 28 ч.

12.2.2.4 После инкубации посевов проводят учет результатов, подсчитывая количество лунок в поддоне, изменивших цвет среды с синего на зеленый (см. таблицу 4), и по таблице Б.1 (приложение Б) определяют НВЧ энтерококков.

12.3 Методы определения Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa) в питьевой воде с использованием тест-набора Pseudalert или тест-набора с аналогичными характеристиками

12.3.1 Качественный метод для определения Pseudomonas aeruginosa

12.3.1.1 Во флакон со 100 $см^3$ исследуемой пробы воды вносят содержимое одного блистера реагента Pseudalert или реагента с аналогичными характеристиками и перемешивают до полного растворения, аналогично 12.1.1.1.

12.3.1.2 Затем посевы помещают в термостат и инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 24—28 ч.

12.3.1.3 После инкубации посевов проводят учет результатов с помощью УФ-лампы по 12.1.1.5, отмечая наличие голубой флуоресценции среды согласно таблице 5.

Таблица 5 — Интерпретация результатов исследования питьевой воды с помощью тест-набора Pseudalert и тест-системы Quanti-Tray или тест-набора и тест-системы с аналогичными характеристиками

Наличие или отсутствие флуоресценции	Результат
Отсутствие флуоресценции	Отрицательный — Pseudamonas aeruginosa не обнаружены
Голубая флуоресценция	Положительный — Pseudamonas aeruginosa обнаружены

Голубая флуоресценция среды указывает на наличие в исследуемом образце воды P.aeruginosa.

По сравнению с отрицательной контрольной пробой цвет голубой флуоресценции должен быть более интенсивным.

12.3.2 Определение наиболее вероятного числа Pseudomonas aeruginosa с помощью тест-системы Quanti-Tray и тест-набора Pseudalert или тест-набора и тест-системы с аналогичными характеристиками

12.3.2.1 Во флакон со 100 $см^3$ исследуемой пробы воды вносят содержимое одного блистера реагента Pseudalert или реагента с аналогичными характеристиками и перемешивают до полного растворения, аналогично 12.1.1.1.

12.3.2.2 Содержимое флакона переливают, в соответствии с инструкцией, в промаркированные поддоны с лунками Quanti-Tray или поддоны с аналогичными характеристиками, после чего запаивают в герметизаторе Quanti-Tray Sealer PLUS или в герметизаторе с аналогичными характеристиками по 12.1.2.2.

12.3.2.3 Герметично запаянные поддоны инкубируют в термостате при температуре (36 ± 2) °С в течение 24—28 ч. Не допускается инкубирование посевов свыше 28 ч.

12.3.2.4 После инкубации посевов поддон просматривают в ультрафиолетовом свете для выявления Pseudomonas aeruginosa согласно 12.1.1.5. При наличии голубой флуоресценции проводят учет результатов, подсчитывая количество положительных лунок с флуоресценцией (см. таблицу 5), и по таблице Б.1 (приложение Б) определяют НВЧ Pseudomonas aeruginosa.

12.4 Контроль качества питательных и дифференциальных сред и тест-наборов Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert или тест-наборов с аналогичными характеристиками

12.4.1 Контроль качества питательных, дифференциальных сред и тест-наборов проводят каждой партии с учетом срока годности.

Для контроля качества питательных, дифференциальных сред и тестовых наборов рекомендуется использовать 18—24-часовые культуры тест-штаммов официальных национальных и международных (АТСС) коллекций микроорганизмов, выращенных на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С для положительного и отрицательного контроля с типичными биохимическими свойствами, например:

- Escherichia coli 1257, Escherichia coli ATCC 25922 или Escherichia coli ATCC 11775, Klebsiella pneumoniae ATCC 31488 (положительный контроль) и Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 или Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (отрицательный контроль) при использовании тест-наборов Colilert-18 или тест-наборов с аналогичными характеристиками;
- Enterococcus faecalis или Enterococcus faecium 35667 (положительный контроль), Serratia marcescens 43862 (отрицательный контроль) при использовании тест-набора Enterolert-DW или тест-набора с аналогичными характеристиками;
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 или 10145 Pseudomonas fluorescens 13525 (положительный контроль), E.coli 1257 или 25922 (отрицательный контроль) при использовании тест-набора Pseudalert или тест-набора с аналогичными характеристиками.

12.4.2 Каждый из контрольных штаммов бактерий высевают на питательный агар и инкубируют в течение 18—28 ч при температуре (36 ± 2) °С для получения изолированного роста колоний.

12.4.3 Контроль питательных сред проводят по наличию роста бактерий и оценке характерных свойств бактерий с проведением подтверждающих тестов.

12.4.4 После инкубации посевов бактериологической петлей снимают одну изолированную колонию и вносят в промаркированный флакон со стерильной водопроводной водой объемом 100 $см^3$, осторожно перемешивают для получения гомогенной массы, стараясь не намочить пробку.

12.4.5 После перемешивания вносят полностью содержимое из блистера соответствующего тест-набора (Colilert-18, Enterolert DW и Pseudalert или тест-набора с аналогичными характеристиками). Дальнейшую процедуру осуществляют в соответствии с качественной оценкой исследования по 12.1.1, 12.2.1, 12.3.1 и с последующей инкубацией в течение 18—28 ч.

12.4.6 Результаты контроля интерпретируют в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 — Основные параметры контроля качества тест-наборов Colilert-18, Enterolert DW и Pseudalert или тест-наборов с аналогичными характеристиками и учет результатов

Тестовые системы/ определяемый показатель	Положительный контроль			Отрицательный контроль		
	Тест-штаммы	Учет результатов		Тест-штаммы	Учет результатов	
		Цвет	Результат		Цвет	Результат
Colilert-18/ колиформные бактерии	Escherichia coli Klebsiella pneumoniae	Желтый	Обнаружены	P.aeruginosa	Цвет в лунках не изменился	Не обнаружены
Colilert-18/ E.coli	Escherichia coli	Желтый с флуоресценцией	Обнаружены	P.aeruginosa или Klebsiella pneumoniae	Бесцветный или желтый без флуоресценции	Не обнаружены
Enterolert-DW/ энтерококки	Enterococcus faecalis Enterococcus faecium	Зеленый	Обнаружены	Serratia marcescens	Голубой	Не обнаружены
Pseudalert/ P.aeruginosa	P.aeruginosa	Голубой с флуоресценцией	Обнаружены	E.coli	Флуоресценция отсутствует	Не обнаружены

12.4.7 Оценку достоверности полученных результатов, а также повторяемости, воспроизводимости и правильности измерений проводят в соответствии с приложением В.

13 Контрольные (референтные) штаммы микроорганизмов

В качестве контрольных (эталонных) штаммов используют тест-штаммы с типичными биохимическими свойствами из официально признанных коллекций микроорганизмов, отличающиеся генетической стабильностью и изученными фенотипическими характеристиками, в том числе чувствительностью к антибактериальным препаратам. В условиях лаборатории штаммы должны иметь паспорт и храниться в соответствии с действующими санитарными правилами таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культур была минимальной.

Для длительного хранения штаммы находятся в лиофилизированном виде или в виде суспензии микроорганизмов в стабилизирующем растворе в замороженном состоянии при температуре минус 70 °С и ниже в морозильной камере или в жидком азоте. Возможно хранение культур на бусинах при температуре минус 70 °С.

Для непродолжительного хранения рабочих штаммов их выращивают в пробирке со скошенным агаром и хранят в холодильнике при температуре 2 °С — 8 °С, субкультивируют в соответствии с ГОСТ ISO 11133 или другими утвержденными в установленном порядке методическими документами и стандартами или используют готовые культуры на петлях или в гранулах.

Рабочую культуру готовят накануне исследования, высевая со среды хранения (например, с полужидкого агара) в пробирки со скошенным питательным агаром, с питательным бульоном или на специальные питательные или дифференциальные среды (если готовые культуры на петлях или в гранулах).

В случае необходимости (при длительном хранении) для повышения активности культуры ее необходимо предварительно провести через питательные бульоны.

Приложение А
(обязательное)

Постановка оксидазного теста и определение грам-принадлежности для подтверждения наличия в пробе воды колиформных бактерий

А.1 Оксидазный тест с тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлоридом

В качестве реактива для оксидазного теста используют тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлорид.

Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями с питательной среды переносят на кружок фильтровальной бумаги большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченной реактивом тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлоридом для определения оксидазной активности. Оксидазный тест считают положительным, если в течение 1—4 мин появляется окрашивание колоний в фиолетово-коричневый цвет.

В случае необходимости дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных бактерий проводят пересев колоний на подтверждающие среды непосредственно с мембранного фильтра, расположенного на кружке фильтровальной бумаги с реактивом. Время пересева не ограничено.

А.2 Оксидазный тест с диметил-п-фенилендиамин дигидрохлоридом и α-нафтолом

В качестве реактива для оксидазного теста используют диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид с α-нафтолом.

Мембранный фильтр с выросшими на нем колониями с питательной среды переносят на кружок фильтровальной бумаги ненамного большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченной реактивом диметил-п-фенилендиамин дигидрохлоридом с α-нафтолом для определения оксидазной активности. Оксидазный тест считают положительным, если появляется окрашивание колоний в синий цвет.

Допускается использовать готовые к употреблению диски СИБ-оксидаза, соблюдая сроки хранения.

После появления первых признаков положительного теста (окрашивание колоний в синий цвет), но не позднее чем через 4 мин, мембранный фильтр переносят обратно на питательную среду.

В случае необходимости дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных бактерий проводят пересев колоний на подтверждающие среды непосредственно с мембранного фильтра, расположенного на питательной среде.

Посев целесообразно проводить не сразу после определения оксидазной активности, а после выдерживания на питательной среде свыше 5 мин.

А.3 Постановка оксидазного теста способом посева штрихом

Полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают двумя-тремя каплями одного из указанных выше реактивов для оксидазного теста. Если используют бумажные индикаторные системы (СИБ), то их смачивают дистиллированной водой.

С мембранных фильтров отбирают по три-четыре изолированные колонии каждого типа из числа характерных для колиформных бактерий и бактерий семейства Enterobacteriaceae колоний и наносят штрихом или бляшкой на подготовленную фильтровальную бумагу с помощью платиновой петли или стеклянной палочки.

Примечание — Металлическая петля из нихрома дает ложноположительную реакцию при работе с реактивом тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлоридом.

Оксидазный тест считают положительным, если в течение 1 мин появляется окрашивание в сине-фиолетовый цвет. Тест считают отрицательным, если цвет в месте нанесения культуры не изменяется.

При получении нечеткого результата колонии пересевают на питательный агар для получения изолированных колоний, посевы инкубируют при температуре (36 ± 2) °С в течение 24—26 ч, а затем проводят повторное определение оксидазной активности.

А.4 Определение грам-принадлежности

На обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей каплю дистиллированной воды.

Вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют по поверхности стекла.

Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки.

На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциана фиолетового на 0,5—1,0 мин, снимают бумагу.

Наливают раствор Люголя на 0,5—1,0 мин, сливают раствор Люголя.

Стекло промывают в этиловом спирте в течение 0,5—1,0 мин, пока не перестанет отходить краситель.

Затем стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1—2 мин фуксином Циля, разведенным 1:10 дистиллированной водой.

После промывания и просушивания препарата мазок микроскопируют: грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску; грамположительные микроорганизмы окрашиваются в синий цвет.

Отношение бактерий к окраске по методу Грама допускается определять прибором для автоматического окрашивания мазков по Граму. Допускается использовать промышленные наборы для окраски.

Приложение Б
(обязательное)

Определение наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов в 100 см^3 воды с помощью тест-системы Quanti-Tray (51 лунка) или тест-системы с аналогичными характеристиками

Таблица Б.1

Число лунок с положительной реакцией	Наиболее вероятное число (НВЧ)	Граница доверительного интервала при P = 0,95	
		Нижняя	Верхняя
0	Менее 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,3	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5

Окончание таблицы Б.1

Число лунок с положительной реакцией	Наиболее вероятное число (НВЧ)	Граница доверительного интервала при P = 0,95	
		Нижняя	Верхняя
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	Св. 200,5	146,1	…

Приложение В
(обязательное)

Оценка повторяемости, воспроизводимости и достоверности при оценке различия средних значений с использованием критерия Стьюдента-Фишера

Достоверность различия средних значений количества колоний, выросших на контрольной и исследуемой среде/мембранных фильтрах, оценивают с использованием критерия Стьюдента для вероятности 95 %.

Для определения достоверности различия средних величин двух вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента сначала рассчитывают дисперсию для каждого сравниваемого ряда значений, далее вычисляется критерий Стьюдента *t*.

В.1 Определение дисперсии

Дисперсию σ^2 вычисляют по формуле

$$\sigma^2 = \frac{\sum(x_n - M)^2}{N-1}, \quad \text{(В.1)}$$

где x_n — варианты количества колоний на чашках (фильтрах) на данной среде;

M — среднее арифметическое значение количества выросших колоний;

N — количество посевов в исследовании выполненных на данной среде.

В.2 Расчет значения критерия Стьюдента

Критерий Стьюдента *t* вычисляют по формуле

$$|t| = (M_1 - M_2)\sqrt{\frac{1-2(N_1+N_2)^{-1}}{\frac{\sigma_1^2}{N_2}+\frac{\sigma_2^2}{N_1}}}, \quad \text{(В.2)}$$

где M_1 и M_2 — сравниваемые средние арифметические значения количества колоний;

σ_1 и σ_2 — дисперсии сравниваемых рядов посевов;

N_1 и N_2 — количество посевов в исследуемых вариационных рядах.

Для оценки достоверности различия средних величин полученное значение критерия сравнивают в таблице В.1 значением, для числа степеней свободы $\nu = N_1 + N_2 - 2$ и вероятности 95 %. Знак критерия не принимают во внимание.

Если полученное значение критерия более значения, приведенного в таблице В.1, то различие между сравниваемыми средними значениями достоверно.

Таблица В.1 — Значения критерия достоверности t_{st} по Стьюденту-Фишеру при трех уровнях вероятности *p* и различных числах степеней свободы ν.

Число степеней свободы ν	Уровень вероятности *p*			Число степеней свободы ν	Уровень вероятности *p*		
	0,95	0,99	0,999		0,95	0,99	0,999
1	12,71	63,66	637	11	2,20	3,11	4,44
2	4,30	9,92	31,60	12	2,18	3,06	4,32
3	3,18	5,84	12,94	13	2,16	3,01	4,22
4	2,78	4,60	8,61	14	2,15	2,98	4,14
5	2,57	4,03	6,86	15	2,13	2,95	4,07
6	2,45	3,71	5,96	16	2,12	2,92	4,02
7	2,37	3,50	5,41	17	2,11	2,90	3,97
8	2,31	3,36	5,04	18	2,10	2,88	3,92
9	2,26	3,25	4,78	19	2,09	2,86	3,88
10	2,23	3,17	4,59	20	2,09	2,85	3,85

Окончание таблицы В.1

Число степеней свободы ν	Уровень вероятности p			Число степеней свободы ν	Уровень вероятности p		
	0,95	0,99	0,999		0,95	0,99	0,999
21	2,08	2,83	3,82	29	2,05	2,76	3,66
22	2,07	2,82	3,79	30—34	2,04	2,75	3,65
23	2,07	2,81	3,77	35—39	2,03	2,72	3,59
24	2,06	2,80	3,75	40—44	2,02	2,70	3,55
25	2,06	2,79	3,73	45—69	2,01	2,66	3,50
26	2,06	2,78	3,71	70—110	1,98	2,63	3,39
27	2,05	2,77	3,69	120 и выше	1,96	2,58	3,29
28	2,05	2,76	3,67				

Оценку неопределенности измерений необходимо проводить в соответствии с нормативным документом, действующим на территории государства, принявшего стандарт*.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 21748—2012 «Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений».

Библиография

[1] Технический регламент Евразийского экономического союза ТР ЕАЭС 044/2017 О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральнукю воду

УДК 628.1.03:579.68:006.354 ОКС 67.160.01

Ключевые слова: вода питьевая, ОМЧ, колиформные бактерии, общие колиформные бактерии, бактерии кишечной палочки, E.coli, Pseudomonas aeruginosa, энтерококки, метод, экспресс-метод, тест-система

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *М.В. Лебедевой*

Сдано в набор 09.11.2021. Подписано в печать 08.12.2021. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,76.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

МКС 67.160.01

Поправка к ГОСТ 34786—2021 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 3.3	**общее микробное число;** ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч, видимых с увеличением в два раза, и при температуре (22 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.	**общее микробное число;** ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, способных образовывать видимые при увеличении в два раза колонии на питательном агаре при температуре (36 ± 2) °С (при определении показателя «ОМЧ при 37 °С») в течение (24 ± 2) ч и при температуре (22 ± 2) °С (при определении показателя «ОМЧ при 22 °С») в течение (72 ± 2) ч для учета сапрофитных водных микроорганизмов.
Пункт 3.7	Оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки,	Оксидазоотрицательные грамотрицательные, не образующие спор палочки,
	в течение (24 ± 3) ч	в течение (24 ± 2) ч
Пункт 3.11	факультативно анаэробных	факультативно-анаэробных
Пункт 9.1.4, первый абзац	в соответствии с А.4 (приложение А)	в соответствии с А.4 (приложение А) (допускается использовать тест Грегерсена)
Примечание	(44 ± 2) °С	(44 ± 0,5) °С
Подраздел 10.2, третий абзац	не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.	Вынимают один пакет из упаковки, слегка постукивают, чтобы гранулы среды оказались на дне пакета, после чего надламывают его верхнюю часть, не дотрагиваясь до открытой части пакета, чтобы избежать внешнего загрязнения питательной среды.
Пункт 11.1.3	в течение 2 ч	в течение 24 ч

(ИУС № 4 2022 г.)

МКС 67.160.01

Поправка к ГОСТ 34786—2021 Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и энтерококков

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 3.10	в течение 24—48 ч и	в течение 24—48 ч или
Раздел 4, первый абзац, первое перечисление	петрифильмы (Petrifilm) или	петрифильмы (Petrifilm), петритесты или
Подраздел 7.3, наименование	с использованием петрифильмов — тест-систем	с использованием тест-систем
Пункт 7.3.1	петрифильмы (Petrifilm) или	петрифильмы (Petrifilm), петритесты или
Пункт 7.3.2, четвертый абзац	петрифильм	петрифильм, петритест
Подраздел 9.6, первый абзац	Петрифильм тест-системы	Петрифильм, петритест — тест-системы
Подраздел 10.1. Пункт 10.1.2, восьмой абзац, перечисление в)	каплю свежеприготовленной 3 %-ной перекиси водорода	каплю 3 %-ной перекиси водорода
Подраздел 11.1. Пункт 11.1.7. Примечание	Среду Бонде	Среду Бонде (pH = 7,0 – 7,4)
	0,28 г фосфата натрия,	0,28 г фосфата натрия трехзамещенного или лимоннокислого натрия трехзамещенного,
Примечание, последний абзац	—	Срок хранения не более 1 месяца, возможно приготовление данной среды из кристаллогидратов с пересчетом на основное вещество.
Библиографические данные	ОКС 67.160.01	МКС 67.160.01

(ИУС № 10 2025 г.)

gost.e-ecolog.ru