МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОГО САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

Определение колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия)

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Издание официальное

Москва 2004

gost.e-ecolog.ru

Определение колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия)

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия): Методические рекомендации.- М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.- 26 с.

1. Разработаны: Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Брагина И.В., Кривопалова Н.С., Минаева Н.А., Белобородова О.К.), Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии (Котляров В.М., Фирсова Т.Е., Чевелева С.С.), МУП «Уфаводоканал» (Кантор Л.И., Труханова Н.В., Майтова Р.Ф.), центром госсанэпиднадзора в Южном Административном округе г.Москвы (Митрофанова Т.А., Чернявский Г.И., Гудков А.А.), фирмой «Лаб-БиоМед», (Соколов Д.М., Кашинцев И.В.).
2. Утверждены и введены в действие Заместителем главного государственного санитарного врача Российской Федерации – Главным врачом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России Е.Н.Беляевым 10.02.2004 г.
3. Введены впервые.

Содержание

Раздел 1. Определение колиформных бактерий и E.coli в пищевых продуктах, продовольственном сырье; смывах с объектов внешней среды 4

1. Общие положения и область применения 4
2. Нормативные ссылки..... 5
3. Требования к помещениям и технике безопасности..... 6
4. Аппаратура, материалы, питательные среды..... 6
5. Принцип действия хромогенных и флюорогенных питательных сред..... 6
6. Сущность методов..... 7
7. Отбор и подготовка проб..... 8
8. Подготовка к проведению испытания..... 8
9. Порядок проведения испытания..... 10
   9.1. Выявление колиформных бактерий и E.coli в определенной навеске образца..... 10
   9.2. Определение количества колиформных бактерий и E.coli..... 11
10. Учет и оценка результатов испытаний..... 12

Приложение №1. 13
Приложение №2. 14
Приложение №3. 15

Раздел 2. Определение общих колиформных бактерий и E.coli в воде..... 16

1. Общие положения и область применения..... 16
2. Нормативные ссылки..... 16
3. Требования к помещениям и технике безопасности..... 17
4. Аппаратура, материалы, питательные среды..... 18
5. Принцип действия хромогенных и флюорогенных индикаторных сред..... 18
6. Сущность методов..... 20
7. Методы отбора проб..... 20
8. Подготовка к проведению испытаний..... 20
9. Порядок проведения испытания..... 22
   9.1. Определение количества общих колиформных бактерий и E.coli методом мембранной фильтрации..... 22
   9.2. Качественное определение общих колиформных бактерий и E.coli методом прямого посева..... 23
10. Учет и оценка результатов испытаний 24

Приложение №1. 25
Приложение №2. 26

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Главного государственного санитарного врача Российской Федерации – Главный врач Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава России
Е.Н.Беляев

10 февраля 2004 г.
№ 24ФЦ / 513
Дата введения: 01 марта 2004 г.

Определение колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред производства Merck (Германия)

Методические рекомендации

Раздел 1. Определение колиформных бактерий и E.coli в пищевых продуктах, продовольственном сырье; смывах с объектов внешней среды

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации устанавливают методы проведения лабораторных исследований по ускоренному определению и выявлению колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред в образцах пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий), продовольственного сырья; смывов с объектов внешней среды.

1.2. Методические рекомендации разработаны в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», Положением о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, Положением о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации.

1.3. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и санитарно-эпидемиологической службы федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих государственный и ведомственный контроль; в лабораториях организаций, осуществляющих производственный контроль, а также в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения указанных испытаний.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52–ФЗ от 30 марта 1999 г.
2.2. Закон РФ «О защите прав потребителей» от 7 февраля 1992 г.
2.3. Закон РФ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» № 29–ФЗ от 2 января 2000 г.
2.4. «Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации», утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.
2.5. «Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.
2.6. СП 1.2.731–99 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.
2.7. ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218-96) Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований.
2.8. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
2.9. СанПиН 2.3.2.1280-03 Дополнения и изменения №2 к СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
2.10. ГОСТ 26668–85 Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов.
2.11. ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.
2.12. ГОСТ 26670–91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.
2.13. ГОСТ 30518-97/ГОСТ Р 50474-93 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).
2.14. ГОСТ 30726-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида E.coli.
2.15. ИСО 16649. Количественное определение Escherichia coli в пищевых продуктах и кормах.
2.16. ГОСТ 19569-89 Стерилизаторы паровые медицинские. Общие технические требования и методы испытаний.
2.17. ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.
2.18. ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.
2.19. ГОСТ 16317-87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия.
2.20. ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.
2.21. ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия.

3. Требования к помещениям и технике безопасности

Требования безопасности, общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать требованиям СП 1.2.731-99, ГОСТ Р 51446.

4. Аппаратура, материалы, питательные среды*

4.1.	Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37°С с отклонением от заданной ± 1°С	
4.2.	Автоклав или стерилизатор паровой.	ГОСТ 19569
4.3.	Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа Masticator (или аналогичный) со стерильными полиэтиленовыми пакетами.	IUL, Cat.№470
4.4.	Облучатель бактерицидный.	
4.5.	Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 1000г и допустимой погрешностью ±10мг.	ГОСТ 24104
4.6.	Баня водяная с подогревом до температуры 100±2°С	
4.7.	Холодильник, позволяющий поддерживать температуру +2-4°С.	ГОСТ 16317
4.8.	УФ лампа 4Вт (или 6Вт), 366нм.	
4.9.	Пипетки градуированные 1-го и 2-го классов точности вместимостью 1 $см^3$, 10 $см^3$.	ГОСТ 29227
4.10.	Пробирки бактериологические.	ГОСТ 25336
4.11.	Горелка газовая или спиртовая	ГОСТ 25336
4.12.	Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300
4.13.	Хромогенные и флюорогенные индикаторные среды	
	4.13.1. Fluorocult LMX Broth	Merck, Cat.№110620
	4.13.2. Chromocult Coliform Agar	Merck, Cat.№110426
	4.13.3. Chromocult Coliform Agar ES (усиленной селективности)	Merck, Cat.№100850
4.14.	Реактив Ковача	Merck, Cat.№109293

5. Принцип действия хромогенных и флюорогенных питательных сред

Селективные хромогенные и флюорогенные индикаторные среды предназначены для ускоренного одновременного определения общих колиформных бактерий и E.coli в исследуемом образце.

Принцип действия хромогенных и флюорогенных сред основан на выявлении специфических ферментов - ß-галактозидазы колиформных бактерий; ß-глюкуронидазы и триптофаназы E.coli.

Специфическая активность ферментов проявляется в результате расщепления хромогенных и флюорогенных субстратов, входящих в состав индикаторных сред, с образованием флюоресцирующих или имеющих окраску продуктов, которые изменяют цвет (вызывают флюоресценцию) жидких сред или характерно окрашивают колонии на агаризованных средах.

---

* Производство питательных сред компании Merck KGaA (Германия) имеет международный сертификат качества ISO 9001:2000.

На среде **Fluorocult LMX Broth** ß-галактозидаза колиформных бактерий расщепляет хромогенный субстрат (X-GAL) с образованием окрашенного продукта, который изменяет цвет среды со светло-желтого на сине-зеленый. Фермент ß-глюкуронидаза E.coli расщепляет флюорогенный субстрат (MUG*) с образованием флюоресцирующего (при воздействии УФ-света) продукта.

На средах **Chromocult Coliform Agar** и **Chromocult Coliform Agar ES** ß-галактозидаза колиформных бактерий расщепляет хромогенный субстрат (Salmon-GAL*) с образованием хромогенного продукта, который окрашивает колонии в розовый (до красного) цвет. Ферменты ß-галактозидаза и ß-глюкуронидаза E.coli расщепляют хромогенные субстраты (Salmon-GAL и X-GLUC*) с образованием хромогенных продуктов, которые окрашивают колонии в темно-синий (до фиолетового) цвет.

Фермент триптофаназа выявляется при расщеплении триптофана, включенного в состав сред Fluorocult LMX Broth и Chromocult Coliform Agar, с подтверждением образования индола реактивом Ковача.

Для целей настоящих МР применяются следующие определения:

Колиформные бактерии – микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, характеризующиеся наличием фермента β-галактозидазы, способного расщеплять специфические хромогенные субстраты, входящие в состав селективных индикаторных сред.

E.coli – колиформные бактерии, характеризующиеся наличием фермента β-глюкуронидазы, способного расщеплять специфические хромогенные или флюорогенные субстраты, входящие в состав селективных индикаторных сред, и фермента триптофаназы, расщепляющей триптофан.

Входящие в состав индикаторных сред качественные пептоны и фосфатный буфер обеспечивают оптимальные условия роста колиформных бактерий; триптофан дает возможность проведения индольного теста для окончательного подтверждения E.coli; пируват натрия восстанавливает поврежденные клетки колиформных бактерий и повышает чувствительность метода. Селективные агенты (лаурилсульфат натрия, тергитол 7, соли желчных кислот и пропионовая кислота) ингибируют рост сопутствующей микрофлоры.

Метод одновременного определения колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных питательных сред является высокочувствительным, специфичным, позволяет сократить время исследования до 24 часов.

6. Сущность методов

6.1. Метод выявления колиформных бактерий и E.coli основан на высеве определенного количества исследуемого образца или его разведений в жидкие селективные хромогенные среды; инкубировании посевов; учете изменения цвета и

* См.состав питательных сред.

флюоресценции среды с образцами; подтверждении образования индола для E.coli.

6.2. Метод определения количества колиформных бактерий и E.coli основан на высеве определенного количества образца или его разведений на агаризованные хромогенные селективные среды; инкубировании посевов; выявлении и подсчете характерно окрашенных колоний.

7. Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовку проб проводят по ГОСТ 26668, ГОСТ 26669 и другим действующим ГОСТ и НД на анализируемый вид образцов, а также в соответствии с НД по контролю за предприятиями торговли, общественного питания, пищевой промышленности и лечебно-профилактическими учреждениями.

8. Подготовка к проведению испытания

8.1. Состав, приготовление и условия хранения индикаторных сред.

8.1.1. **Fluorocult LMX Broth** (п.4.13.1)

Состав среды в (г/дм^3)
Пептоны - 5,0;
хлорид натрия - 5,0;
сорбитол - 1,0;
триптофан – 1,0;
гидрофосфат калия двузамещенный - 2,7;
дигидрофосфат калия - 2,0;
лаурилсульфат натрия - 1,0;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,1
хромогенный субстрат:
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (X-GAL) - 0,008;
флюорогенный субстрат:
4-метилумбеллиферил-ß-D-глюкуронид (MUG) - 0,005.

Приготовление среды
В 1 дм^3 дистиллированной воды растворить 17г сухой питательной среды.
Стерилизовать в автоклаве при температуре (121±1)°С 15 минут.
Приготовленная среда прозрачная светло-желтого цвета.

Условия хранения
При комнатной температуре до 6 месяцев.

8.1.2. **Chromocult Coliform Agar** (п.4.13.2)

Состав среды в (г/дм^3).
Пептоны - 3,0;
хлорид натрия - 5,0;
дигидрофосфат натрия однозамещенный - 2,2;
гидрофосфат натрия двузамещенный - 2,7;

пируват натрия - 1,0;
триптофан - 1,0;
агар-агар - 10,0;
сорбитол - 1,0;
тергитол-7 – 0,15;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,1;
хромогенные субстраты:
6-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (Salmon-GAL) – 0,15;
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-глюкуронид (X-GLUC) – 0,1.

Приготовление среды.
В 1 дм^3 дистиллированной воды растворить 26,5 г сухой питательной среды. Нагревать на кипящей водяной бане, периодически помешивать до полного растворения (около 35 мин). Не автоклавировать! Не перегревать!
Среду разлить в стерильные чашки Петри или пробирки по 15 см^3.
Готовые чашки со средой опалесцируют, желтоватого цвета.
Для предотвращения от высыхания поместить чашки со средой в пластиковые мешки.

Условия хранения.
Чашки со средой хранить в холодильнике при температуре (2-4)°С.
Срок годности готовой среды на чашках - 3 недели.

8.1.3. **Chromocult Coliform Agar ES** (усиленной селективности) (п.4.13.3).

Состав среды в (г/дм^3).
Пептоны - 5,0;
хлорид калия – 7,5;
MOPS - 10,0;
соли желчных кислот – 1,15;
пропионовая кислота – 0,5;
агар-агар - 10,0;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,1;
хромогенные субстраты:
6-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (Salmon-GAL) – 0,15;
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-глюкуронид (X-GLUC) – 0,1.

Приготовление среды.
В 1 дм^3 дистиллированной воды растворить 34,5 г сухой питательной среды. Нагревать на кипящей водяной бане, периодически помешивать до полного растворения (около 45 мин). Не автоклавировать! Не перегревать!
Среду разлить в стерильные чашки Петри или пробирки по 15 см^3.
Готовые чашки со средой прозрачные и бесцветные.
Для предотвращения от высыхания поместить чашки со средой в пластиковые мешки.

Условия хранения.
Чашки со средой хранить в холодильнике при температуре (2-4)°С.
Срок годности готовой среды на чашках – 2 недели.

9. Порядок проведения испытания

9.1. Выявление колиформных бактерий и E.coli в определенной навеске образца.

9.1.1. Навеску анализируемого образца (или ряд десятикратных разведений) в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие колиформных бактерии и E.coli в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01, внести в среду Fluorocult LMX Broth (п. 8.1.1).

Соотношение между количеством (массой) высеваемого образца или его эквивалентным разведением и питательной средой - 1:9 по объему.
Жидкие образцы можно не разводить.
Твердые образцы измельчить в гомогенизаторе (п.4.3).
Тампоны со смывами, взятые с объектов окружающей среды погрузить в пробирку с 5 $см^3$ среды Fluorocult LMX Broth.

9.1.1.1. Проверить наличие фоновой флюоресценции образца (особенно для проб, содержащих морепродукты) при облучении УФ-лампой (п.4.8).

9.1.2. Посевы инкубировать при температуре (37±1)°С в течение 21±3 часов.

9.1.3. После инкубирования отметить наличие изменения цвета среды с образцами (смывами).

9.1.3.1. Отсутствие изменения цвета среды учитывать как отсутствие в исследуемых образцах (смывах) колиформных бактерий и E.coli.

9.1.3.2. Изменение цвета среды со светло-желтого на сине-зеленый подтверждает наличие колиформных бактерий.

9.1.3.3. Для образцов, в которых среда изменила свой цвет, проверить наличие флюоресценциии при облучении УФ лампой. Флюоресценция среды указывает на возможное наличие E.coli.

Для подтверждения E.coli к флюоресцирующей среде добавить 1 $см^3$ реактива Ковача (п.4.14) (индольный тест). Образование красного слоя на поверхности культуральной жидкости указывает на образование индола и подтверждает наличие E.coli (Табл.2).

Табл. №2.

Микроорганизмы	Цвет среды	Флюоресценция	Индольный тест
Колиформные бактерии	Сине-зеленый	-	
E.coli	Сине-зеленый	+	+
Другие грам(-) бактерии	Светло-желтый		

Схема проведения испытаний приведена в Приложении №1.

Примечание:

Для продовольственного сырья и пищевых продуктов, в том числе кисломолочных, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий, исследованных в соответствии с ГОСТ 30518 и ГОСТ 30726, для подтверждения принадлежности микроорганизмов к колиформным бактериям и E.coli, пересеять образцы с жидких селективных сред на поверхность хромогенных агаризованных сред Chromocult Coliform Agar (п.8.1.2) или Chromocult Coliform Agar ES (п.8.1.3) с последующей идентификацией по п.9.2.3.

Схема проведения испытаний приведена в Приложении №3.

9.2. Определение количества колиформных бактерий и E.coli.

9.2.1. При определении количества колиформных бактерий и E.coli в 1 г ($см^3$) образца в соответствии с ГОСТ 30518, ГОСТ 30726 проводить посев навески образца (или его разведения) в объеме 0,1 или 0,2 $см^3$ поверхностным методом, а в объеме 1 $см^3$ - глубинным методом. При посеве использовать агаризованные среды Chromocult Coliform Agar (п.8.1.2) или Chromocult Coliform Agar ES (п.8.1.3).

Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посевы поверхностным и глубинным методами провести по ГОСТ 26670.

Жидкие образцы можно не разводить.
Твердые образцы измельчить в гомогенизаторе (п.4.3).

9.2.2. Посевы инкубировать при температуре (37±1)°С в течение 21±3 часов.

9.2.3. После инкубирования подсчитать характерно окрашенные колонии, выросшие на чашках Петри.

9.2.3.1. Колиформные бактерии (за исключением E.coli) образуют колонии розового (до красного) цвета.

9.2.3.2. E.coli образуют колонии темно-синего (до фиолетового) цвета.

Для подтверждения E.coli на среде Chromocult Coliform Agar нанести каплю реактива Ковача (п.4.14) непосредственно на характерно окрашенные колонии (индольный тест). Изменение цвета реагента до розово-красного в течение нескольких секунд подтверждает наличие E.coli.

9.1.3.3. Для подсчета количества колиформных бактерий сложить количество характерно окрашенных колоний по п.9.1.3.1 и п.9.1.3.2.

Дифференциация грамотрицательных бактерий на хромогенных средах Chromocult Coliform Agar и Chromocult Coliform Agar ES представлена в Табл.3.

Табл.№3.

Микроорганизмы	Цвет колоний	Индол
Колиформные бактерии (за исключением E.coli)	Розовый, красный	
E.coli	Темно-синий, фиолетовый	+
Другие грам(-) бактерии	Бесцветный, Бирюзовый	
Грам(+) бактерии	Нет роста	

Схема проведения испытаний приведена в Приложении №2.

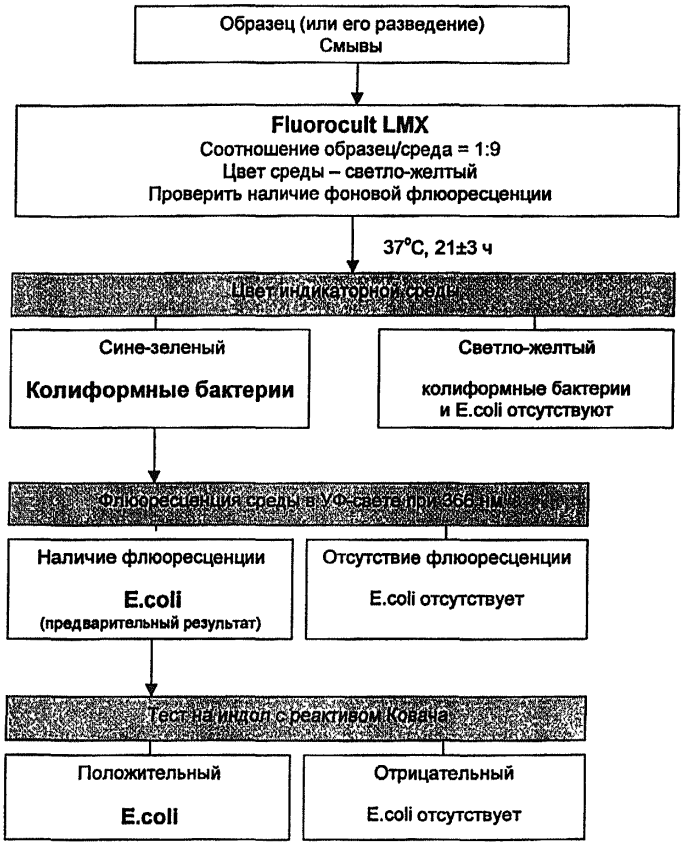
10. Учет и оценка результатов испытаний

10.1. Учет и оценку результатов испытаний по выявлению и количественному определению колиформных бактерий и E.coli в определенной навеске образца провести по ГОСТ 26670.

10.2. Учет и оценку результатов испытаний смывов провести в соответствии с НД по контролю за микробиологической обсемененностью окружающей среды на предприятиях торговли, общественного питания и лечебно-профилактических учреждений.

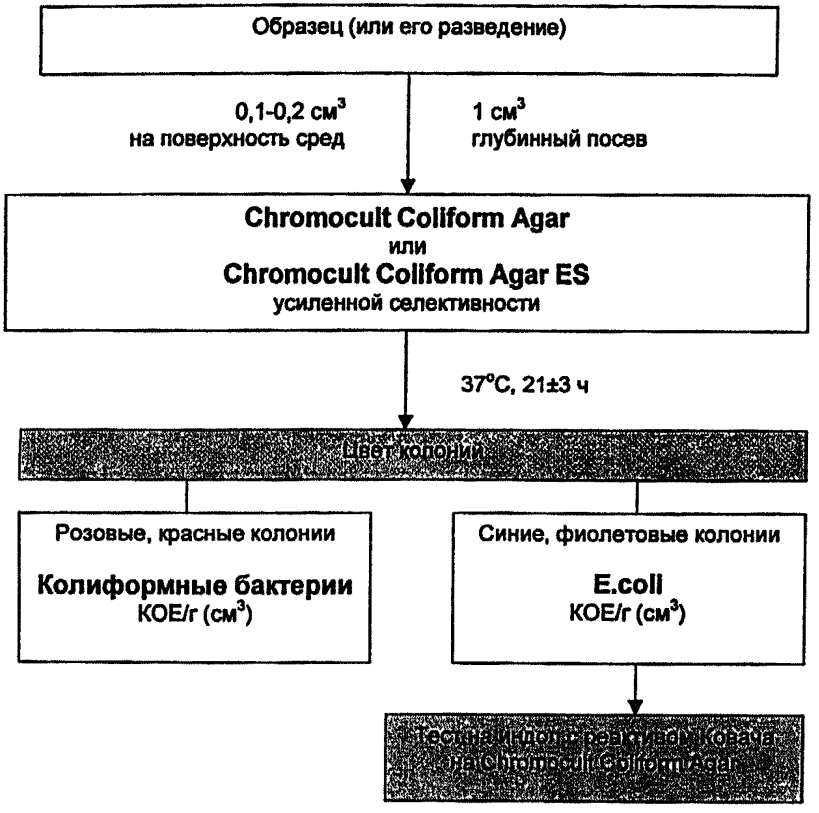
Приложение №1

Выявление колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенной среды Fluorocult LMX

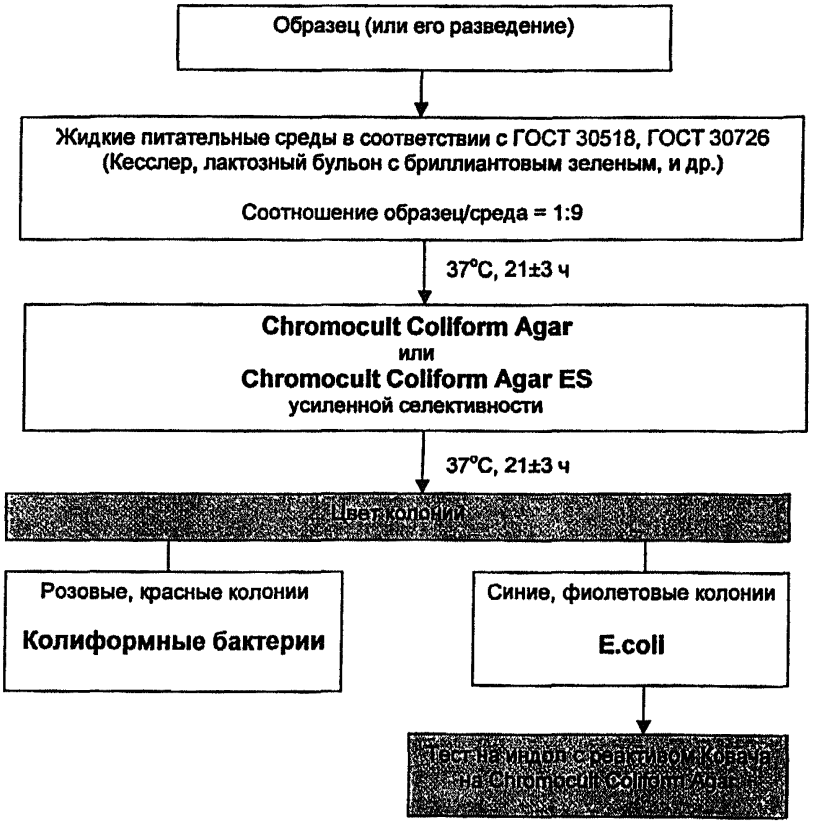


Приложение №2

Определение количества колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных индикаторных сред



Выявление колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных индикаторных сред



Раздел 2. Определение общих колиформных бактерий и E.coli в воде

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации устанавливают методы проведения лабораторных исследований по ускоренному качественному и количественному определению общих колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных индикаторных сред в пробах продукции безалкогольного производства, воды питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, водных объектов рекреации, сточных вод и др.

1.2. Методические рекомендации разработаны в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», Положением о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, Положением о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации.

1.3. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях учреждений государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и санитарно-эпидемиологической службы федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих государственный и ведомственный контроль; в лабораториях организаций, осуществляющих производственный контроль, а также в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения санитарно-микробиологических исследований воды.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52–ФЗ от 30 марта 1999 г.

2.2. Закон РФ «О защите прав потребителей» от 7 февраля 1992 г.

2.3. «Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации», утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.

2.4. «Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24 июля 2000 г.

2.5. СП 1.2.731–99 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

2.6. ИСО 9308-1, 2000. Качество воды.

2.7. ИСО 9308-3, 1998. Качество воды

2.8. ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб.

2.9. ГОСТ Р 51593-2000 Вода питьевая. Отбор проб.

2.10. СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества.

2.11. МУК 4.2.1018-01 Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды.

2.12. СанПиН 2.1.4.1175-02 Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников.

2.13. СанПиН 2.1.4.1116-02 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества.

2.14. МУ 2.1.4.1184-03 Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества.

2.15. МР № 96/225 от 07.04.97 Контроль качества и безопасности минеральных вод по химическим и микробиологическим показателям.

2.16. МУ №2000/34 Классификация минеральных вод и лечебных грязей для целей сертификации.

2.17. СанПиН 2.1.2.1188-03 Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества.

2.18. СанПиН 2.1.5.980-00 Гигиенические требования к охране поверхностных водоемов.

2.19. МУ 2.1.5.800-99 Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод.

2.20. ГОСТ 30712-2001 Продукты безалкогольной промышленности. Методы микробиологического анализа.

2.21. ГОСТ 19569-89 Стерилизаторы паровые медицинские. Общие технические требования и методы испытаний.

2.22. ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

2.23. ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

2.24. ГОСТ 16317-87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия.

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

2.26. ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия.

3. Требования к помещениям и технике безопасности

Требования безопасности, общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям СП 1.2.731-99.

4. Аппаратура, материалы, питательные среды*

4.1.	Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37°С с отклонением от заданной ± 1°С.	
4.2.	Автоклав или стерилизатор паровой.	ГОСТ 19569
4.3.	Облучатель бактерицидный.	
4.4.	Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 1000г и допустимой погрешностью ±10мг.	ГОСТ 24104
4.5.	Прибор для мембранной фильтрации под вакуумом и устройство для создания разрежения (0,5-1,0) атм.	
4.6.	Мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45мкм	
4.7.	Холодильник позволяющий поддерживать температуру +2-4°С.	ГОСТ 16317
4.8.	Баня водяная с подогревом до температуры 100±2°С.	
4.9.	УФ лампа 4Вт (или 6Вт), 366нм.	
4.10.	Пипетки градуированные 1-го и 2-го классов точности вместимостью 1 $см^3$, 10 $см^3$.	ГОСТ 29227
4.11.	Пробирки бактериологические.	ГОСТ 25336
4.12.	Горелка газовая или спиртовая	ГОСТ 25336
4.13.	Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300
4.14.	Хромогенные и флюорогенные индикаторные среды	
	4.14.1. Readycult Coliforms 100**	Merck, Cat.№110620
	4.14.2. Chromocult Coliform Agar**	Merck, Cat.№110426
	4.14.3. Chromocult Coliform Agar ES (усиленной селективности)	Merck, Cat.№100850
4.15.	Реактив Ковача	Merck, Cat.№109293

5. Принцип действия хромогенных и флюорогенных питательных сред

Селективные хромогенные и флюорогенные индикаторные среды предназначены для ускоренного одновременного определения общих колиформных бактерий и E.coli в исследуемой пробе воды.

Принцип действия хромогенных и флюорогенных сред основан на выявлении специфических ферментов - ß-галактозидазы колиформных бактерий; ß-глюкуронидазы и триптофаназы E.coli.

Специфическая активность ферментов проявляется в результате расщепления хромогенных и флюорогенных субстратов, входящих в состав индикаторных сред, с

---

* Производство питательных сред компании Merck KGaA (Германия) имеет международный сертификат качества ISO 9001:2000.

** Питательные среды одобрены US-EPA (Американская организация по защите окружающей среды), Код Федерального Регистра США - 40 CFR, часть141.

образованием флюоресцирующих или имеющих окраску продуктов, которые изменяют цвет (вызывают флюоресценцию) жидких сред или характерно окрашивают колонии на агаризованных средах.

На среде **Readycult Coliforms 100** ß-галактозидаза колиформных бактерий расщепляет хромогенный субстрат (X-GAL*) с образованием окрашенного продукта, который изменяет цвет среды со светло-желтого на сине-зеленый. Фермент ß-глюкуронидаза E.coli расщепляет флюорогенный субстрат (MUG*) с образованием флюоресцирующего (при воздействии УФ-света) продукта.

На средах **Chromocult Coliform Agar** и **Chromocult Coliform Agar ES** ß-галактозидаза колиформных бактерий расщепляет хромогенный субстрат (Salmon-GAL*) с образованием хромогенного продукта, который окрашивает колонии в розовый (до красного) цвет. Ферменты ß-галактозидаза и ß-глюкуронидаза E.coli расщепляют хромогенные субстраты (Salmon-GAL и X-GLUC*) с образованием хромогенных продуктов, которые окрашивают колонии в темно-синий (до фиолетового) цвет.

Фермент триптофаназа выявляется при расщеплении триптофана, включенного в состав сред Readycult Coliforms 100 и Chromocult Coliform Agar, с подтверждением образования индола реактивом Ковача.

Для целей настоящих МР применяются следующие определения:

Общие колиформные бактерии – микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, характеризующиеся наличием фермента β-галактозидазы, способного расщеплять специфические хромогенные субстраты, входящие в состав селективных индикаторных сред.

E.coli – колиформные бактерии, характеризующиеся наличием фермента β-глюкуронидазы, способного расщеплять специфические хромогенные или флюорогенные субстраты, входящие в состав селективных индикаторных сред, и фермента триптофаназы, расщепляющей триптофан.

E.coli – как индикатор фекального загрязнения регламентирован Директивой ЕС 98/83 взамен термотолерантных бактерий.

Входящие в состав индикаторных сред качественные пептоны и фосфатный буфер обеспечивают оптимальные условия роста колиформных бактерий; триптофан дает возможность проведения индольного теста для окончательного подтверждения E.coli; пируват натрия восстанавливает поврежденные клетки колиформных бактерий и повышает чувствительность метода. Использование селективных агентов с различным ингибирующим эффектом позволяет дифференцировано подходить к определению колиформных бактерий и E.coli в зависимости от уровня микробной контаминации пробы воды.

Метод одновременного определения колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных и флюорогенных питательных сред является высокочувствительным, специфичным, позволяет сократить время исследования до 24 часов.

---

* См.состав питательных сред.

6. Сущность методов

6.1. Определение количества общих колиформных бактерий и E.coli проводят методом мембранной фильтрации. Метод основан на фильтровании нормируемого объема воды через мембранные фильтры; инкубировании посевов на агаризованных хромогенных индикаторных средах; последующем выявлении и подсчете характерно окрашенных колоний, выросших на фильтре.

6.2. Качественное определение общих колиформных бактерий и E.coli проводят методом прямого посева. Метод основан на внесении стерильной гранулированной индикаторной среды в нормируемый объем воды; инкубировании посевов; учете изменения цвета и флюоресценции среды с образцами.

7. Методы отбора проб

Отбор и хранение проб воды для микробиологических исследований проводить в соответствии с ГОСТ Р 51592, ГОСТ Р 51593, МУК 4.2.1018-01.

8. Подготовка к проведению испытаний

8.1. Состав, приготовление и условия хранения индикаторных сред.

8.1.1. **Readycult Coliforms 100** (п.4.14.1)

Состав среды в (грамм/пакет)
Пептоны - 0,5;
хлорид натрия – 0,5;
сорбитол – 0,1;
триптофан – 0,1;
гидрофосфат калия двузамещенный – 0,27;
дигидрофосфат калия – 0,2;
лаурилсульфат натрия – 0,1;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,01.
хромогенный субстрат:
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (X-GAL) - 0,008;
флюорогенный субстрат:
4-метилумбеллиферил-ß-D-глюкуронид (MUG) - 0,005;

Приготовление среды.
Среда поставляется сухая, стерильная, гранулированная, упакована в индивидуальные пакеты, из расчета один пакет на 100мл образца воды. Среда добавляется непосредственно к исследуемой пробе воды.

Условия хранения.
Среда хранится в соответствии с инструкциями производителя.

8.1.2. **Chromocult Coliform Agar** (п.4.14.2)

Состав среды в (г/дм^3).
Пептоны - 3,0;
хлорид натрия - 5,0;
дигидрофосфат натрия однозамещенный - 2,2;
гидрофосфат натрия двузамещенный - 2,7;
пируват натрия - 1,0;
триптофан - 1,0;
агар-агар - 10,0;
сорбитол - 1,0;
тергитол-7 – 0,15;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,1;
хромогенные субстраты:
6-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (Salmon-GAL) – 0,15;
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-глюкуронид (X-GLUC) – 0,1;

Приготовление среды.
В 1 дм^3 дистиллированной воды растворить 26,5 г сухой питательной среды. Нагревать на кипящей водяной бане, периодически помешивать до полного растворения (около 35 мин). Не автоклавировать! Не перегревать!
Среду разлить в стерильные чашки Петри или пробирки по 15 см^3.
Готовые чашки со средой опалесцируют, желтоватого цвета.
Для предотвращения от высыхания поместить чашки со средой в пластиковые мешки.

Условия хранения.
Чашки со средой хранить в холодильнике при температуре (2-4)°С.
Срок годности готовой среды на чашках - 3 недели.

8.1.3. **Chromocult Coliform Agar ES** (усиленной селективности) (п.4.14.3).

Состав среды в (г/дм^3).
Пептоны - 5,0;
хлорид калия – 7,5;
MOPS - 10,0;
соли желчных кислот – 1,15;
пропионовая кислота – 0,5;
агар-агар - 10,0;
1-изопропил-ß-D-1-тио-галактопиранозид (IPTG) - 0,1;
хромогенные субстраты:
6-хлор-3-индолил-ß-D-галактопиранозид (Salmon-GAL) – 0,15;
5-бром-4-хлор-3-индолил-ß-D-глюкуронид (X-GLUC) – 0,1;

Приготовление среды.
В 1 дм^3 дистиллированной воды растворить 34,5 г сухой питательной среды. Нагревать на кипящей водяной бане, периодически помешивать до полного растворения (около 45 мин). Не автоклавировать! Не перегревать!
Среду разлить в стерильные чашки Петри или пробирки по 15 см^3.
Готовые чашки со средой прозрачные и бесцветные.
Для предотвращения от высыхания поместить чашки со средой в пластиковые мешки.

Условия хранения.
Чашки со средой хранить в холодильнике при температуре (2-4)°С.
Срок годности готовой среды на чашках – 2 недели.

8.2. Подготовку проб воды, фильтровального аппарата, мембранных фильтров проводить в соответствии с МУК 4.2.1018-01, ГОСТ 30712.

9. Порядок проведения испытания

9.1. Определение количества общих колиформных бактерий и E.coli методом мембранной фильтрации

9.1.1. Объем воды, установленный в соответствии с НД, фильтровать через мембранный фильтр с соблюдением требований, изложенных в ГОСТ 30712, МУК 4.2.1018-01.

Фильтр поместить на поверхность агаризованной среды Chromocult Coliform Agar (п.8.1.2) - при исследовании проб воды с низким уровнем микробной контаминации (питьевая вода) или на поверхность агаризованной среды усиленной селективности Chromocult Coliform Agar ES (п.8.1.3) - при исследовании проб воды с высоким уровнем микробной контаминации (вода поверхностных водоемов, сточные воды).

9.1.2. Посевы инкубировать при температуре (37±1)°С в течение 21±3 часов.

9.1.3. После инкубирования подсчитать характерно окрашенные колонии, выросшие на фильтре.

9.1.3.1. Колиформные бактерии (за исключением E.coli) образуют колонии розового (до красного) цвета.

9.1.3.2. E.coli образуют колонии темно-синего (до фиолетового) цвета.

Для подтверждения E.coli на среде Chromocult Coliform Agar нанести каплю реактива Ковача (п.4.13) на характерно окрашенные колонии (индольный тест). Изменение цвета реагента до розово-красного в течение нескольких секунд подтверждает наличие E.coli.

9.1.3.3. Для подсчета количества общих колиформных бактерий сложить количество характерно окрашенных колоний по п.9.1.3.1 и п.9.1.3.2.

Дифференциация грамотрицательных бактерий на хромогенных средах Chromocult Coliform Agar и Chromocult Coliform Agar ES представлена в Табл. №2.

Табл.№2.

Микроорганизмы	Цвет колоний	Индол
Колиформные бактерии (за исключением E.coli)	Розовый, красный	
E.coli	Темно-синий, фиолетовый	+
Другие грам(-) бактерии	Бесцветный, Бирюзовый	
Грам(+) бактерии	Нет роста	

Схема проведения испытаний приведена в Приложении №1.

9.2. Качественное определение общих колиформных бактерий и E.coli методом прямого посева

9.2.1. К 100 мл пробы воды (при необходимости исследуют 3 объема по 100 мл) добавить среду Readycult Coliforms 100* (п.8.1.1), надломив верхнюю часть пакета. Закрыть флакон и перемешать до полного растворения гранулированной среды. Проба окрашивается в светло-желтый цвет.

9.2.2. Посев инкубировать при температуре (37±1)°С в течение 21±3 часов или при комнатной температуре (20-25)°С до 48 часов.

9.2.3. После инкубирования отметить наличие изменения цвета среды с пробами.

9.2.3.1. Отсутствие изменения цвета среды учитывать как отсутствие в исследуемых пробах воды колиформных бактерий и E.coli.

9.2.3.2. Изменение цвета среды со светло-желтого на сине-зеленый подтверждает наличие колиформных бактерий.

9.2.3.3. Для проб, в которых среда изменила свой цвет проверить наличие флюоресценции при облучении УФ лампой (п.4.9). Флюоресценция среды указывает на возможное наличие E.coli.

Для подтверждения E.coli к флюоресцирующей среде добавить 2,5 $см^3$ реактива Ковача (индольный тест). Образование красного слоя на поверхности культуральной жидкости указывает на образование индола и подтверждает наличие E.coli (Табл.№3).

Таблица №3.

Микроорганизмы	Цвет среды	Флюоресценция	Индольный тест
Колиформные бактерии	Сине-зеленый	-	
E.coli	Сине-зеленый	+	+
Другие грам(-) бактерии	Светло-желтый		

Схема проведения испытаний приведена в Приложении №2.

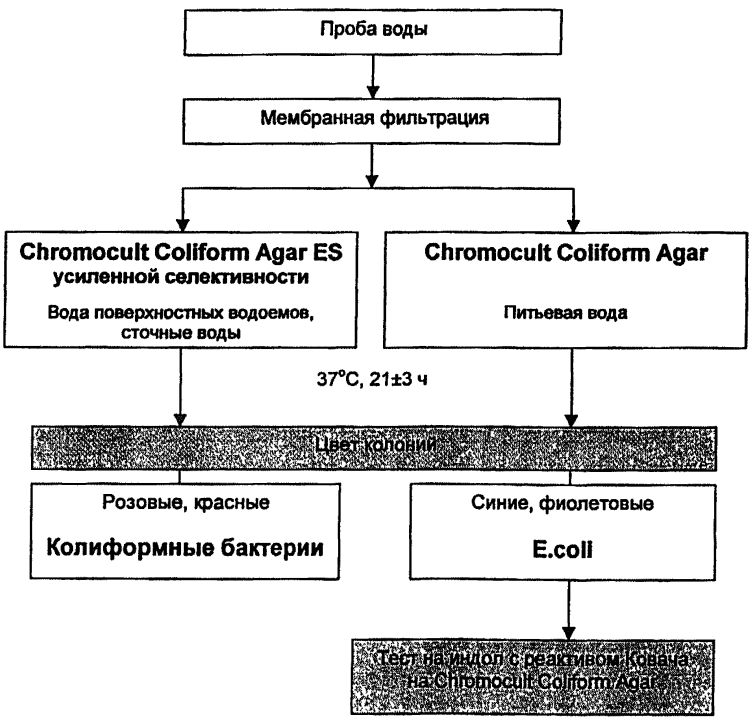
* Использование индикаторной среды Readycult Coliforms 100 позволяет определить наличие общих колиформных бактерий и E.coli в 100мл воды.

10. Учет и оценка результатов испытаний

Учет и оценка результатов испытаний по определению общих колиформных бактерий и E.coli в нормируемом объеме воды методом мембранной фильтрации или методом прямого посева проводить по МУК 4.2.1018-01, МУ 2.1.5.800-99, ГОСТ 30712, МУ 2.1.4.1184-03 в зависимости от типа воды.

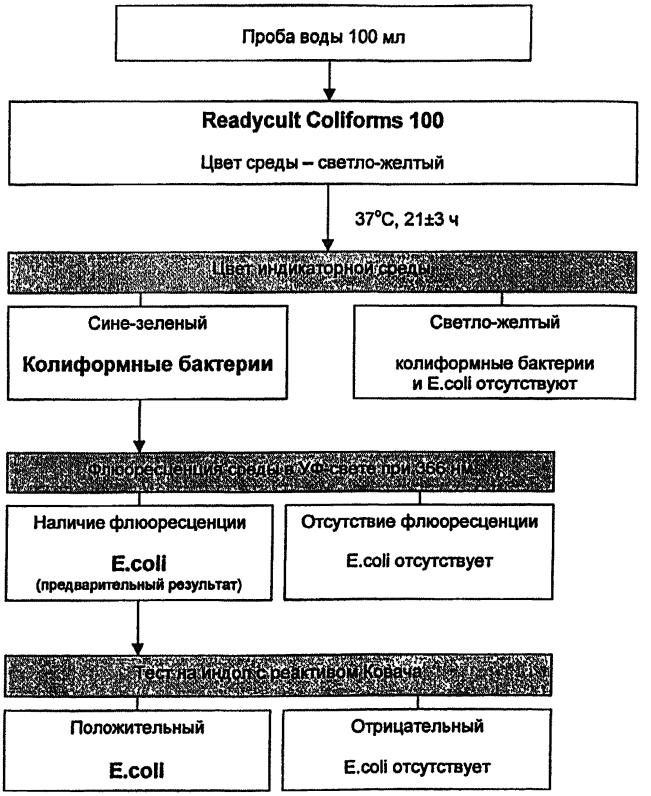
Приложение №1

Определение количества общих колиформных бактерий и E.coli с использованием хромогенных индикаторных сред



Приложение №2

Качественное определение общих колиформных бактерий и E.coli с использованием флюорогенной среды Readycult Coliforms 100



gost.e-ecolog.ru