ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52426— 2005 (ИСО 9308-1:2000)

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ ESCHERICHIA COLI И КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ

Часть 1

Метод мембранной фильтрации

ISO 9308-1:2000
Water quality — Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method (MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2007

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Рабочей группой специалистов Закрытого акционерного общества «РОСА», Муниципального государственного унитарного предприятия «Мосводоканал», Государственного учреждения «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Российской академии медицинских наук, Открытого акционерного общества «Научно-исследовательский институт коммунального водоснабжения и очистки воды», Федерального государственного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии», Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, Федерального государственного учреждения здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, Общества с ограниченной ответственностью «Протектор» на основе собственного аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 343 «Качество воды»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 декабря 2005 г. № 378-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 9308-1:2000 «Качество воды. Обнаружение и количественный учет Escherichia coli и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации» (ISO 9308-1:2000 «Water quality — Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method»). При этом дополнительные положения, фразы и слова, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены в тексте стандарта курсивом. Ссылка на международный стандарт ИСО 8199—1988 «Качество воды. Общее руководство по количественному учету микроорганизмов при культивировании» ввиду отсутствия соответствующего национального стандарта заменена ссылкой на МУК 4.2.1018—2001 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. Методические указания».

Положения, выделенные в тексте стандарта вертикальной линией, расположенной слева от текста, заменяют ссылку на международный стандарт ИСО 8199—1988

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июнь 2007 г.

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2006
© Стандартинформ, 2007

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 2
3 Термины и определения 3
4 Сущность метода 3
5 Оборудование, *материалы* 4
6 Культуральные среды, реактивы, *культуры микроорганизмов* 5
7 Отбор проб 6
8 Проведение испытаний 6
9 Обработка результатов испытаний 9
10 Оформление результатов 9
11 Обеспечение качества проведения испытаний 10
Приложение А (справочное) Дополнительные характеристики колиформных бактерий и E.coli 10
Приложение В (обязательное) Методики приготовления культуральных сред и реактивов 11
Библиография 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОДА ПИТЬЕВАЯ

ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ ESCHERICHIA COLI И КОЛИФОРМНЫХ БАКТЕРИЙ

Часть 1

Метод мембранной фильтрации

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

Дата введения — 2007—01—01

1 Область применения

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

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

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

Издание официальное

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5208—81 Спирт бутиловый нормальный технический. Технические условия

ГОСТ 5830—79 Спирт изоамиловый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17626—81 Казеин технический. Технические условия

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

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

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

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2000 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83) Микробиология. Корма, комбикорма, комбинированное сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

ГОСТ Р 51592—2000 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р 51593—2000 Вода питьевая. Отбор проб

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. 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 с соответствующими определениями, *включающие признаки и характеристики бактерий*:

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

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

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

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

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

4 Сущность метода

4.1 Основные положения

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

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

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

4.2 Фильтрация и инкубация

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

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

4.3 Оценка и подтверждение (стандартный тест)

Характерные колонии *(8.3.2)* на мембране учитывают как колонии лактозоположительных бактерий. Для подтверждения наличия колиформных бактерий и E.coli

выполняют пересев случайно выбранных характерных колоний и проводят испытания, подтверждающие отсутствие их оксидазной активности и образование индола. Вычисляют количество колиформных бактерий и E.coli в 100 мл пробы питьевой воды.

4.4 Оценка и подтверждение (ускоренный тест)

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

5 Оборудование, *материалы*

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

5.1 Стерилизатор паровой.

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

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

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

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

5.5 Оборудование для мембранной фильтрации согласно *[1]*.

5.6 Фильтры мембранные, изготовленные из эфирцеллюлозных материалов, диаметром, как правило, от 47 до 50 мм, с номинальным диаметром пор 0,45 мкм и, предпочтительно, с нанесенной сеткой *(для концентрирования микроорганизмов). Допускается использовать фильтры согласно [1].*

Примечание — Мембранные фильтры не должны обладать свойствами, ингибирующими или стимулирующими рост микроорганизмов. Чернила, используемые для нанесения сетки, не должны оказывать влияние на рост бактерий. Если мембранные фильтры поставляют нестерильными, их следует простерилизовать в соответствии с инструкциями изготовителя. Качество каждой партии мембран следует проконтролировать в соответствии [2], поскольку использование различных торговых марок фильтров может привести к различиям в формировании *колоний и их* окраски.

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

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

5.8 Пинцет плоскоконечный для работы с мембранными фильтрами.

5.9 Лампа ультрафиолетовая с длиной волны 254 нм.

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

5.10 Подложки под фильтры диаметром не менее диаметра используемого фильтра.

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

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

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

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

5.15 Палочки стеклянные.

5.16 Пластмассовые или платиновые бактериологические петли.

5.17 Деревянный аппликатор.

5.18 Пробки (силиконовые, резиновые, ватно-марлевые и др.), выдерживающие стерилизацию сухим жаром.

5.19 Пластмассовые или металлические крышки (колпачки).

5.20 Горелки газовые или спиртовки по ГОСТ 25336.

5.21 Средства защиты (очки, резиновые перчатки).

Материалы и лабораторная посуда, поставляемые нестерильными, стерилизуют в соответствии с инструкциями, приведенными *в [1].*

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

6 Культуральные среды, реактивы, *культуры микроорганизмов*

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

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

L-триптофан.

р-диметиламинобензальдегид.

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

Амиловый спирт по ГОСТ 5830.

Бромтимоловый синий.

Бутиловый спирт по ГОСТ 5208.

Гептадецилсульфат натрия (тергитол 7).

Дрожжевой экстракт.

Казеин трипсиновой ферментации по ГОСТ 17626.

Лактоза.

Лактозный ТТХ агар с гептадецилсульфатом натрия.

Мясной экстракт.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Пептон по ГОСТ 13805.

Реактив для индольного теста.

Реактив для оксидазного теста.

Реактив Ковача.

Соевый пептон.

Соли желчи.
Соляная кислота по ГОСТ 3118.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.
Тетраметил-р-фенилендиамин гидрохлорид.
Триптон.
Триптон-желчный агар (ТЖА).
Триптон-соевый агар неселективный (ТСА).
Фуксин-сульфитная среда Эндо (среда Эндо).

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

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

Для приготовления культуральных сред *и реактивов* применяют дистиллированную воду *по ГОСТ 6709* или деионизированную воду, не содержащую веществ, способных ингибировать рост бактерий в условиях проведения испытаний, *с удельной электрической проводимостью не более 3,0 мкСм/см по [2].* Дистиллированную или деионизированную воду хранят в стеклянной посуде.

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

Среду Эндо готовят по [1].

6.3 Культуры микроорганизмов — согласно [1].

7 Отбор проб

Пробы питьевой воды отбирают и транспортируют в соответствии с требованиями *ГОСТ Р 51592, ГОСТ Р 51593.*

8 Проведение испытаний

8.1 Подготовка пробы *воды и мембранных фильтров*

Подготовку пробы воды *и мембранных фильтров* перед фильтрацией и посевом *микроорганизмов* на селективные среды проводят в соответствии с *[1] и ГОСТ Р 51426 (при необходимости разведения пробы).*

Испытания проводят сразу после отбора проб.

Если пробы хранят при температуре окружающей среды не выше 25 °С в защищенном от света месте, то испытания начинают не позднее чем через 6 ч после отбора пробы.

В исключительных случаях пробы допускается хранить при (5 ± 3) °С не более 24 ч до начала проведения испытаний.

8.2 Фильтрация

Фильтруют 100 мл или бóльший объем исследуемой пробы (например, *300 мл* — для воды, расфасованной в емкости), используя мембранный фильтр и оборудование для мембранной фильтрации, *согласно [1].*

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

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

8.3 Инкубация и подтверждение (стандартный тест)

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

Примечания

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

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

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

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

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

8.3.3 Оксидазный и индольный тесты

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

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

** Применение среды Эндо предусмотрено до 2010 г. на период, необходимый для накопления статистических данных по применению среды с тергитолом 7.*

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

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

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

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

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

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

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

Примечания

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

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

8.3.4 Допускается проводить одновременное определение оксидазной активности всех выросших на среде Эндо по 8.3.1 колоний микроорганизмов непосредственно на мембранном фильтре без пересева по 8.3.3. Для этого в чашку Петри помещают фильтровальную бумагу и обильно смачивают реактивом для оксидазного теста, приготовленным по приложению В (В.5.3). Затем переносят стерилизованным пинцетом мембранный фильтр с выросшими на нем по 8.3.1 колониями микроорганизмов на фильтровальную бумагу. Появление насыщенной сине-фиолетовой окраски всей колонии или ее ободка в течение 0,5—5 мин считают положительной оксидазной реакцией, указывающей на оксидазную активность.

Колонии микроорганизмов, дающие положительную оксидазную реакцию, не учитывают. Колонии, не изменившие окраски (отрицательная оксидазная реакция), учитывают как колонии колиформных бактерий и подсчитывают их. При необходимости проведения дальнейшей идентификации оксидазоотрицательных колоний, пересев проводят сразу же после проявления реакции.

8.4 Инкубация и подтверждение (ускоренный тест)

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

Допускается объединение двух агаризованных сред в одной чашке Петри в виде двух слоев в соответствии с приложением В (В.4). При этом помещают мембранный фильтр на свежеприготовленную двуслойную среду, состоящую из ТСА и ТЖА, и проводят инкубацию сначала при (36 ± 2) °С в течение 4—5 ч, а затем при (44,0 ± 0,5) °С в течение 19—20 ч.

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

Примечания

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

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

9 Обработка результатов испытаний

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

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

При фильтрации пробы объемом более 100 мл или нескольких объемов пробы воды на разных мембранных фильтрах результат испытаний вычисляют по [1], аналогично определению общих колиформных бактерий.

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

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

10 Оформление результатов

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

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

11 Обеспечение качества проведения испытаний

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

Приложение А
(справочное)

Дополнительные характеристики колиформных бактерий и E.coli

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

Колиформные бактерии также имеют фермент β-галактозидазу.

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

E.coli также имеют фермент β-глюкуронидазу.

Приложение В
(обязательное)

Методики приготовления культуральных сред и реактивов

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

В.1.1 Базовая среда

Состав:

лактоза — 20 г;

пептон — 10 г;

дрожжевой экстракт — 6 г;

мясной экстракт — 5 г;

бромтимоловый синий — 0,05 г;

агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—20 г;

дистиллированная вода — 1000 мл.

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

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

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

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

Состав:

2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорид (ТТХ) — 0,05 г;

дистиллированная вода — 100 мл.

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

В.1.3 Раствор гептадецилсульфата натрия

Состав:

гептадецилсульфат натрия (тергитол 7) — 0,2 г;

дистиллированная вода — 100 мл.

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

В.1.4 Среда полного состава

Состав:

базовая среда (по В.1.1) — 100 мл;

раствор ТТХ (по В.1.2) — 5 мл;

раствор гептадецилсульфата натрия (по В.1.3) — 5 мл.

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

В.2 Триптофановый бульон

Состав:

казеин трипсиновой ферментации — 10 г;

L-триптофан — 1 г;

натрий хлористый — 5 г;

дистиллированная вода — до 1000 мл.

Указанные ингредиенты растворяют при нагревании в дистиллированной воде и разливают по 3 мл в пробирки. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, пластиковыми или металлическими крышками (колпачками), затем стерилизуют в течение 15 мин при (121 ± 3) °С. Значение pH готовой к использованию среды — (7,5 ± 0,1) при 25 °С.

Примечание — *Если результаты контроля качества среды согласно [2]* показывают достаточное количество L-триптофана в используемом казеине трипсиновой ферментации, то его в среду не добавляют, а дополнительно вносят 10 г казеина трипсиновой ферментации.

В.3 Неселективный триптон-соевый агар (ТСА)

Состав:

казеин трипсиновой ферментации — 15 г;

соевый пептон — 5 г;

натрий хлористый — 5 г;

агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—25 г;

дистиллированная вода — до 1000 мл.

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

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

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

В.4 Триптон-желчный агар (ТЖА)

Состав:

триптон — 20 г;

соли желчи — 1,5 г;

агар (в форме порошка или хлопьев) — 15—25 г;

дистиллированная вода — до 1000 мл.

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

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

Чашки с двуслойной средой готовят путем заливки горячего ТСА (по В.3) температурой (50 ± 5) °С поверх затвердевшей среды ТЖА, разлитой в чашки, нагретые до комнатной тем-

пературы. Используют такой объем ТСА, который образует слой толщиной около 1 мм (например 2,5 мл в чашке Петри диаметром 55 мм). После затвердения двуслойной среды, при необходимости, ее подсушивают в термостате при (36 ± 2) °С, перевернув чашки вверх дном. Для каждого анализа готовят свежие двуслойные среды (за 30—60 мин до размещения мембранных фильтров в чашках Петри со средой).

В.5 Реактивы

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

Состав:

p-диметиламинобензальдегид — 5 г;

амиловый или бутиловый спирт (не содержащий органических оснований) — 75 мл;

соляная кислота плотностью 1,18 г/мл — 25 мл.

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

Примечания

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

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

В.5.2 Реактив для индольного теста (ускоренный тест)

Состав:

p-диметиламинобензальдегид — 0,5 г;

соляная кислота молярной концентрации 1 моль/л — 100 мл.

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

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

В.5.3 Реактив для оксидазного теста

Состав:

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

дистиллированная вода — 10 мл.

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

Примечание — Тетраметил-*p*-фенилендиамин гидрохлорид является канцерогенным веществом, поэтому приготовление реактива проводят в вытяжном шкафу, используя защитные перчатки и избегая его контакта с кожей.

Библиография

[1] МУК 4.2.1018—2001 *Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001, 42 с.*

[2] МУ 2.1.4.1057—2001 *Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001, 92 с.*

УДК 663.6:006.354 ОКС 13.060.20 Н09 ОКП 01 3100

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

gost.e-ecolog.ru