
**Качество воды. Подсчет кишечных
палочек *Escherichia coli* и
колиформных бактерий.**

**Часть 2.
Метод наиболее вероятного
количества**

*Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria —
Part 2: Most probable number method*

iTeh Standards
(<https://standards.itih.ai>)
Document Preview

ISO 9308-2:2012

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



Ссылочный номер
ISO 9308-2:2012(R)

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 9308-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2012

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	2
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Аппаратура и стеклянная посуда	3
6 Питательные среды и реактивы	4
7 Отбор проб	4
8 Процедура	4
9 Выражение результатов	5
10 Протокол испытания	5
11 Гарантия качества	6
Приложение А (информативное) Дополнительная информация о колиформных бактериях	7
Приложение В (нормативное) Герметизатор Quanti-Tray ⁵) и вычисление результатов	8
Приложение С (информативное) Состав питательной среды Colilert-18	44
Приложение D (информативное) Валидация метода Colilert-18/Quanti-Tray ⁸) для подсчета <i>E.coli</i> и колиформных бактерий в воде	46
Библиография	48

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

ISO 9308-2 подготовлен Техническим Комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 4, *Микробиологические методы*.

Настоящее второе издание отменяет и заменяет первое издание (ISO 9308-2:1990), которое было технически пересмотрено.

ISO 9308 состоит из следующих частей под общим названием *Качество воды. Подсчет кишечных палочек Escherichia coli и колиформных бактерий*:

- *Часть 1. Метод мембранной фильтрации для вод с низкой бактериальной фоновой флорой*
- *Часть 2. Метод наиболее вероятного количества*
- *Часть 3. Миниатюризированный метод (наиболее вероятное количество) для выявления и подсчета E. coli в поверхностных и сточных водах*

Введение

Присутствие и степень фекального загрязнения является важным фактором в оценке качества водоема и риска инфекционных заболеваний для человека. Исследование проб воды на присутствие кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*), которая обычно обитает в теле человека и теплокровных животных, дает показатель такого загрязнения. Анализ на присутствие колиформных бактерий может быть более трудным для интерпретации, потому что некоторые колиформные бактерии живут в почве и пресных поверхностных водах, но не всегда являются кишечными. Тем не менее, наличие колиформных бактерий, хотя и не является доказательством фекального загрязнения, может указывать на нарушения очистки или поступления воды в распределительную систему.

Международная организация по стандартизации (ISO) обращает внимание на тот факт, что заявление о соответствии этому документу может включать также использование патентов на Colilert-18, Quanti-Tray и Quanti-Tray 2000, указанных в данном документе.

ISO не имеет никакого отношения к доказательству, юридической силе и области применения этих патентных прав.

ISO было получено заверение от обладателя настоящего патентного права относительно его/её готовности к лицензионным договорам с заявителями из любой страны безвозмездно или на разумных и недискриминационных условиях. Информацию можно получить из:

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092 USA

Обращается внимание на то, что часть элементов в настоящем документе может подлежать патентным правам, не идентифицированным выше. ISO не несет ответственности за идентификацию таких патентных прав.

ISO 9308-2:2012

ISO (<http://www.iso.org/patents>) и IEC (<http://patents.iec.ch>) ведут в режиме онлайн базы патентных данных, соответствующих их стандартам. Пользователям рекомендуется обращаться к этим базам данных для получения самой последней информации относительно патентов.

Качество воды. Подсчет кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий.

Часть 2.

Метод наиболее вероятного количества

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Лица, использующие эту часть ISO 9308 должны быть знакомы с нормальной лабораторной практикой. В настоящем международном стандарте не предусматривается рассмотрение всех проблем безопасности, если таковые имеются, связанных с его использованием. Пользователь сам должен установить надлежащие нормативы по технике безопасности и защите здоровья и обеспечить их соответствие условиям национального регулирования.

ВАЖНО Весьма важно, чтобы испытания согласно этой части ISO 9308 проводились персоналом с соответствующей квалификацией.

1 Область применения

В настоящей части ISO 9308 устанавливается метод для подсчета кишечных палочек *E. coli* и колиформных бактерий в воде. Метод основан на выращивании целевых организмов в жидкой среде и вычислении “наиболее вероятного количества” (MPN) организмов с помощью таблицы MPN. Этот метод можно применять для всех типов воды, включая те, которые содержат значительное количество взвеси и высокие фоновые количества гетеротрофных бактерий. Однако он не должен использоваться для подсчета колиформных бактерий в морской воде. При подсчете *E. coli* в морских водах обычно требуется разведение 1→10 в стерильной воде, хотя есть данные, что этот метод вполне подходит для некоторых морских вод, в которых концентрация солей ниже обычных значений. При отсутствии данных для поддержки использования этого метода без разведения используется разведение 1→10.

Этот метод состоит в обнаружении *E. coli* на основе экспрессии энзима β-D-глюкуронидазы, и следовательно он не дает возможности для выявления многих из энтерогеморрагических штаммов *E. coli*, которые не типично экспрессируют этот энзим. Кроме того, имеется небольшое количество других штаммов *E. coli*, которые не экспрессируют β-D-глюкуронидазу.

Выбор тестов, используемых для обнаружения и подтверждения колиформной группы бактерий, включая *E. coli*, можно рассматривать как часть непрерывной последовательности. Степень подтверждения на конкретной пробе частично зависит от природы воды и частично от целей исследования. Испытание, описанное в этой части ISO 9308, дает подтвержденный результат без требования дополнительного подтверждения положительных лунок.

ПРИМЕЧАНИЕ Хотя этот метод включает использование счетного устройства, которое имеется в продаже, описанная здесь питательная среда может также использоваться в стандартном формате MPN.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы, целиком или частично, являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 8199, *Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде*

ISO/IEC Guide 2:2004, *Стандартизация и смежные виды деятельности. Общий словарь*

ISO 19458, *Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа*

3 Термины и определения

В данной части этого документа применяются термины и определения, приведенные в ISO/IEC Guide 2, а также указанные ниже.

3.1
колиформная бактерия
coliform bacterium

представитель семейства энтеробактерий, который экспрессирует энзим β-D-галактозидазу

3.2
кишечная палочка
Escherichia coli

представитель семейства энтеробактерий, который экспрессирует не только энзим β-D-галактозидазу, но и β-D-глюкуронидазу

4 Сущность метода

Разовую упаковку дегидратированной питательной среды добавляют к пробе воды (100 мл) или к разведению пробы, приготовленному до 100 мл. Пробу с питательной средой мягко встряхивают, чтобы обеспечить адекватное смешивание и растворение среды. Затем пробу с питательной средой, соблюдая стерильность, выливают на планшеты Quanti-Tray¹⁾ или Quanti-Tray/2000¹⁾ для подсчета вплоть до 201 организма или 2 419 организмов на 100 мл соответственно. Планшеты запечатывают с помощью герметизатора Quanti-Tray¹⁾ Sealer и затем инкубируют при (36 ± 2) °C в течение 18 ч до 22 ч.

1) Quanti-Tray торговая марка или зарегистрированная торговая марка фирмы IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в Соединенных штатах и/или других странах. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 9308 и не является рекомендацией ISO для этого продукта.

После инкубации лунки с пробой, которые имеют желтую окраску одинаковой или большей интенсивности по сравнению с лунками компаратора, считаются положительными для колиформных бактерий. Желтые лунки, которые также показывают некоторую степень флуоресценции, считаются положительными для *E. coli*.

С помощью статистических таблиц или простой компьютерной программы можно определить наиболее вероятное количество (MPN) колиформных бактерий и *E. coli* в 100 мл пробы.

ПРИМЕЧАНИЕ Желтая окраска может быть видна невооруженным глазом и является результатом расщепления орто-нитрофенол-галактозида энзимом β -D-галактозидазой. Флуоресценция явно наблюдается при ультрафиолетовом свете (365 нм) и возникает из расщепления молекулы 4-метилумбеллиферил-глюкуронида (MUG) энзимом β -D-глюкуронидазой с образованием флуоресцирующего продукта метилумбеллиферона.

5 Аппаратура и стеклянная посуда

Используется микробиологическое лабораторное оборудование и, в частности, следующая:

5.1 Аппаратура для стерилизации паром (автоклав)

Аппаратура и стеклянная посуда, поставляемые в нестерильном состоянии, должны быть стерилизованы согласно инструкциям, данным в ISO 8199.

5.2 Сушильный шкаф, для стерилизации сухим жаром.

5.3 Инкубатор, с термостатическим регулированием при $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.4 Герметизатор Quanti-Tray¹⁾.

5.5 Стерильные широкогорлые сосуды вместимостью не менее 110 мл.

5.6 Компаратор Quanti-Tray²⁾.

5.7 Ультрафиолетовая лампа, 365 нм.

5.8 Планшеты Quanti-Tray²⁾ или Quanti-Tray/2000²⁾, см. Приложение В.

2) Quanti-Tray торговая марка или зарегистрированная торговая марка фирмы IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в Соединенных штатах и/или других странах. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 9308 и не является рекомендацией ISO для этого продукта.

6 Питательные среды и реактивы

6.1 Основные материалы

В данном методе используется питательная среда Colilert³-18, приготовленная на основе технологии определенного субстрата и имеющаяся в наличии для 100 мл пробы в качестве готового для использования порошка, распределенного в одноразовых упаковках. Каждая одноразовая упаковка содержит достаточно питательной среды (2,8 г) для одного испытания. Питательную среду следует хранить в комнатных условиях (2 °C до 25 °C), защищать от непосредственного солнечного света и хранить до предельного срока, указанного на одноразовой упаковке.

Питательная среда состоит из двух компонентов с окончательными концентрациями, приведенными в Приложении С.

6.2 Разбавитель

Для разведений питательной среды Colilert³-18, следует брать только стерильную воду, без ингибиторов и оксидантов (неионизированную или водопроводную). Использование буферных, солевых или пептонных разбавителей искажает результаты испытания.

6.3 Антивспениватель В

Антивспениватель В является 10 % активной, водорастворимой суспензией силикона.

7 Отбор проб

Отбор проб и доставка их в лабораторию выполняются согласно ISO 19458.

8 Процедура

<https://standards.iteh.ai>
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>

8.1 Подготовка пробы

Пробы следует транспортировать и хранить при (5 ± 3) °C согласно ISO 19458, и анализ начинать в день выборки или в ближайшие 18 ч. В исключительных условиях пробы можно хранить при (5 ± 3) °C не более 24 ч до начала исследования.

8.2 Инокуляция питательной среды

Соблюдая стерильность, вводят единичную одноразовую упаковку питательной среды Colilert⁴-18 (2,8 г) в каждую пробу или разведение объемом 100 мл. Когда питательная среда полностью растворяется, пробу вместе с питательной средой, соблюдая стерильность, выливают в планшет Quanti-Tray⁴ или Quanti-Tray⁴/2000 и затем запечатывают с помощью герметизатора Quanti-Tray⁴. Пробы морской воды обычно следует разбавлять 1→10 стерильной водой. Для того чтобы свести к минимуму пузырьки воздуха в лунках, пробы можно готовить в предварительно стерилизованных бутылках, содержащих антивспениватель В. Альтернативно антивспениватель В можно добавлять в каждую бутылку с

3) Colilert торговая марка или зарегистрированная торговая марка фирмы IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в Соединенных штатах и/или других странах. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 9308 и не является рекомендацией ISO для этого продукта.

4) Colilert и Quanti-Tray торговые марки или зарегистрированные торговые марки фирмы IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в Соединенных штатах и/или других странах. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 9308 и не является рекомендацией ISO для этого продукта.

помощью капельницы. Использование любой формы антивспенивателя является факультативным. Альтернативно для определения MPN пробу воды, в которой растворена питательная среда Colilert⁴⁾-18, можно разливать в стерильные пробирки, используя более традиционный формат MPN (например, 1 × 50 мл и 5 × 10 мл). Если инкубируется единичный объем 100 мл, тогда для обнаружения колиформных бактерий и *E. coli* этот метод можно применять как тест на присутствие/отсутствие. При любом из этих двух подходов пробирки следует предварительно нагревать до $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 20 мин до начала инкубации.

Хотя рекомендуется пробы морской воды перед исследованием разбавлять 1→10 в стерильной неионизированной воде, известно, что в некоторых географических зонах концентрация соли в морской воде достаточно низкая, так что можно проводить инокуляцию без разведения. При использовании этой процедуры следует иметь данные валидации. Соленость морской воды меняется в значительной степени, и именно лаборатория обязана определить, требуется ли для пробы морской воды разведение.

8.3 Инкубация и дифференциация

Инкубируют инокулированные планшеты Quanti-Trays⁴⁾ в течение 18 ч до 22 ч при $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ для подсчета колиформных бактерий и *E. coli*.

8.4 Анализ результатов

После инкубации длительностью от 18 ч до 22 ч исследуют Quanti-Tray⁴⁾ или Quanti-Tray^{4)/2000, и те лунки, которые имеют желтую окраску, такую же или интенсивнее по сравнению с окраской компаратора Quanti-Tray, учитывают как положительные реакции на колиформные бактерии. Планшеты исследуют при ультрафиолетовом свете (365 нм) в темной комнате или в камере, которая защищает от окружающего света. Любые желтые лунки, которые также показывают некоторую степень флуоресценции, учитывают как положительные на *E. coli*. Если результаты становятся неясными через 18 ч (т.е. желтая окраска меньше, чем окраска компаратора), то период инкубации следует продлить до 22 ч. Положительные результаты и для колиформных бактерий и для *E. Coli*, наблюдаемые до окончания 18 ч инкубации, как и отрицательные результаты, наблюдаемые после 22 ч, также действительны.}

ISO 9308-2:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>

9 Выражение результатов

Из числа положительных лунок на Quanti-Tray⁴⁾ можно вычислить MPN/100 мл для колиформных бактерий и *E. coli* с помощью статистических таблиц и компьютерной генерирующей программы для MPN, см. Таблицы В.1 и В.2.

10 Протокол испытания

Протокол испытаний должен содержать как минимум следующую информацию:

- a) используемый метод испытания и ссылку на эту часть ISO 9308;
- b) всю необходимую информацию для полной идентификации пробы;
- c) результаты, выраженные согласно Разделу 9;
- d) любые частные случаи, наблюдаемые в процессе анализа, и любые операции, не установленные в этой части ISO 9308, которые могли повлиять на результаты.

11 Гарантия качества

Лаборатория должна иметь четко определенную систему управления качеством для гарантии, что аппаратура, реактивы и методы являются подходящими для испытания. Использование позитивных, негативных и холостых контрольных образцов является частью испытания.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 9308-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>

Приложение А (информативное)

Дополнительная информация о колиформных бактериях

Колиформные бактерии являются типичными грамм-отрицательными, неспорообразующими, оксидазонегативными, палочковидными бактериями, которые способны к аэробному и факультативно к анаэробному росту в присутствии солей желчных кислот (или других поверхностно-активных веществ с аналогичными свойствами угнетения роста) и которые, помимо экспрессирования β -D-галактозидазы, обычно могут ферментировать лактозу с образованием кислоты и альдегида в течение 48 ч при температуре инкубации $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$. *E. coli* являются колиформными бактериями, которые, помимо экспрессирования β -D-глюкуронидазы, способны продуцировать индол из триптофана в течение (21 ± 3) ч при $(44,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Они дают положительный результат в тесте с метиловым красным и могут исключать L-глутаминовую кислоту, но не способны продуцировать ацетилметилкарбинол, потреблять цитрат в качестве единственного источника углерода или расти на бульоне KCN.

Некоторые штаммы *Escherichia coli*, которые являются отрицательными по β -D-глюкуронидазе, такие как *Escherichia coli* O157, не будут обнаружены как *E. coli*. Так как они положительные по β -D-галактозидазе, они будут появляться как колиформные бактерии.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 9308-2:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/a05b6929-1d9c-478b-86fe-3548911709b6/iso-9308-2-2012>

Приложение В (нормативное)

Герметизатор Quanti-Tray⁵) и вычисление результатов

В.1 Общие вопросы

Герметизатор Quanti-Tray⁵) Sealer представляет собой аппарат термической герметизации для создания уплотнения между лунками в планшете Quanti-Tray. Герметизатор автоматически распределяет жидкость в лунки планшетов Quanti-Tray или Quanti-Tray/2000. Quanti-Tray используется, когда ожидаемое число подсчетов ниже 200 КОЕ/100 мл. Quanti-Tray/2000 можно использовать для вычисления значений MPN вплоть до 2419 КОЕ/100 мл. Таблицы, поставляемые с планшетами, являются эталонами для всех подсчетов при вычислении MPN. Можно также использовать простую статистическую программу для вычисления результатов. При необходимости MPN можно рассчитывать вручную согласно процедурам, представленным ниже.

В.2 Вычисление наиболее вероятного количества (MPN)

В.2.1 Вычисление MPN для IDEXX Quanti-Tray⁵ и Quanti-Tray/2000

В.2.1.1 Quanti-Tray (51 лунка)

Система планшетов Quanti-Tray для подсчета MPN первоначально была разработана в Йельском университете; дополнительный хороший пример определения MPN из серийных разведений можно найти в Бактериологическом аналитическом руководстве Ассоциации США по пищевым продуктам и лекарственным препаратам (имеется в [BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010](#)).

Каждая лунка для пробы имеет приблизительный объем 1,96 мл.

Лунка переполнения будет удерживать минимально 8,5 мл.

Для вычисления наиболее вероятного количества по методу Quanti-Tray MPN (Таблица В.1) см. Уравнение (В.1).

$$N_{\text{MPN}} = N \cdot \ln [N/(N - X)] \quad (\text{В.1})$$

где

N_{MPN} MPN (наиболее вероятное количество);

N общее количество лунок (пробирок), используемых в испытании;

X общее количество положительных лунок (пробирок), наблюдаемых в испытании.

⁵ Quanti-Tray торговая марка или зарегистрированная торговая марка фирмы IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в Соединенных штатах и/или других странах. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 9308 и не является рекомендацией ISO для этого продукта.