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

Часть 1.

**Метод мембранной фильтрации для
воды с низким содержанием
бактериальной флоры**

Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria —

Part 1:

Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

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



Ссылочный номер
ISO 9308-1:2014(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2014

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	1
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Приборы и стеклянная посуда.....	2
6 Культуральные среды и реактивы	3
7 Отбор проб.....	3
8 Процедура	3
8.1 Подготовка пробы	3
8.2 Фильтрация.....	3
8.3 Инкубация и дифференциация.....	3
9 Выражение результатов	4
10 Протокол испытания.....	4
11 Обеспечение качества	4
11.1 Общие вопросы	4
11.2 Испытание рабочих характеристик хромогенного агара для колиформных бактерий (CCA)	5
11.3 Испытание рабочих характеристик оксидазного теста.....	5
Приложение А (информативное) Дополнительная микробиологическая информация о колиформных бактериях	6
Приложение В (нормативное) Состав и приготовление культуральных сред и реактивов	7
Приложение С (информативное) Рабочие характеристики	9
Библиография	10

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).

Процедуры, используемые для разработки этого документа и для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC, Часть 1. В частности, следует отметить различные критерии, необходимые для одобрения различных типов документов ISO. Настоящий документ был подготовлен в соответствии с редакционными правилами, указанными в Директивах ISO/IEC, Часть 2 (see www.iso.org/directives).

Обращается внимание на то, что некоторые элементы данного документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав. Детали любых патентных прав, идентифицированных при разработке настоящего документа, будут указаны во введении и/или в списке патентных заявок, полученных ISO (см. www.iso.org/patents).

Любое фирменное название, используемое в этом документе, указывается только как информация для удобства пользователей и не является рекомендацией.

Объяснение значения специфических терминов ISO и выражений, относящихся к оценке соответствия, а также информацию о строгом соблюдении ISO принципов WTO относительно Технических барьеров в торговле (ТБТ) см. по URL: [Foreword - Supplementary information](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014) (Предисловие – Дополнительная информация)

ISO 9308-1 был разработан Техническим Комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 4, *Микробиологические методы*.

Настоящее третье издание отменяет и заменяет второе издание (ISO 9308-1:2000), которое было технически пересмотрено.

Оно также включает исправление Corrigendum ISO 9308-1:2000/Cor.1:2007

Международный стандарт ISO 9308, имеющий общее название *Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек Escherichia coli и колиформных бактерий*, состоит из следующих частей:

- *Часть 1. Метод мембранной фильтрации для воды с низким содержанием бактериальной флоры*
- *Часть 2. Метод наиболее вероятного количества*
- *Часть 3. Миниатюризированный метод выявления и оценки E. coli в поверхностных и сточных водах (Метод наиболее вероятного количества (МНБК)).*

Введение

Наличие и степень фекальных загрязнений является важным фактором в оценке качества воды и риска инфекционных заболеваний для человека. В результате анализа водных проб на присутствие кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*), которая обычно обитает в кишечнике человека и других теплокровных животных, получают показатель такого загрязнения. Анализ на присутствие колиформных бактерий вызывает больше трудностей для интерпретации, так как некоторые колиформные бактерии живут в почве и поверхностных пресных водах и не всегда имеют кишечное происхождение. Поэтому присутствие колиформных бактерий, хотя и не является доказательством фекального загрязнения, может указывать на нарушения обработки, хранения или распределения.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 9308-1:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

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

Часть 1.

Метод мембранной фильтрации для воды с низким содержанием бактериальной флоры

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Лица, использующие этот международный стандарт, 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 — Необходимо, чтобы испытания согласно этому документу проводились соответственно обученным персоналом.

1 Область применения

В данной части ISO 9308 устанавливается метод для подсчета кишечных палочек *Escherichia coli* (*E. coli*) и колиформных бактерий. Метод основан на мембранной фильтрации, последующем культивировании на хромогенной агаровой среде для колиформных бактерий и подсчете числа целевых организмов в пробе. Из-за низкой селективности дифференциальной агаровой среды фоновый рост может отрицательно влиять на надежный подсчет *E. coli* и колиформных бактерий, например, в поверхностных водах или неглубоких колодцах. Для этих типов воды настоящий метод не годится.

Настоящая часть ISO 9308 главным образом применима для типов воды с низким микробным числом, обуславливающим образование менее 100 общего числа колоний на хромогенном агаре для колиформных бактерий (ССА). Это может быть питьевая вода, дезинфицированная вода бассейнов или обработанная питьевая вода из водоочистных станций.

Некоторые штаммы *E. coli*, являющиеся β-D-глюкуронидазоотрицательными, такие как *Escherichia coli* O157, не будут обнаруживаться как *E. coli*. Они относятся к β-D-галактосидазоположительным штаммам и проявляются как колиформные бактерии на этом хромогенном агаре.

2 Нормативные ссылки

ISO 3696, *Вода, предназначенная для использования в аналитических лабораторных целях. Технические требования и методы испытаний*

ISO 7704, *Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологических анализов*

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

ISO 11133, *Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и испытания для определения рабочих характеристик питательных сред*

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

3 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются определения, данные в руководящих указаниях ISO/IEC Guide 2, и следующие.

3.1 колиформные бактерии
coliform bacteria
представители семейства энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*), которые активируют β-D-галактосидазу

3.2 кишечные палочки *Escherichia coli*
Escherichia coli
E. coli
представители семейства энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*), которые активируют β-D-галактосидазу и β-D-глюкуронидазу

4 Сущность метода

Фильтрация испытательного образца через мембранный фильтр, который удерживает организмы, и помещение мембранного фильтра на пластинку хромогенного агара для колиформных бактерий.

Инкубация мембранного фильтра при $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

Подсчет β-D-галактосидазопозитивных колоний (от розовых до красных) как презумптивных колиформных бактерий, которые не являются *E. coli*. Для избежания ложноположительных результатов, обусловленных оксидазопозитивными бактериями, например, *Aeromonas* spp, презумптивные колонии должны быть подтверждены отрицательной реакцией на оксидазу.

Подсчет β-D-галактосидазо- и β-D-глюкуронидазопозитивных колоний (от темно-синих до фиолетовых) как *E. coli*.

Общее количество колиформных бактерий является суммой оксидазонегативных колоний от розовых до красных и всех колоний от темно-синего до фиолетового цвета

5 Приборы и стеклянная посуда

Ниже приводится обычное микробиологическое лабораторное оборудование.

5.1 Аппарат для паровой стерилизации (автоклав), соответствующий инструкциям, указанным в ISO 8199.

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

5.3 pH метр, с точностью $\pm 0,1$ при $20 ^\circ\text{C}$ до $25 ^\circ\text{C}$.

5.4 Оборудование для мембранной фильтрации.

5.5 Мембранные фильтры, изготовленные из эфиров целлюлозы или другого подходящего материала, диаметром обычно около 47 мм или 50 мм, с характеристиками фильтрации, соответствующими номинальному диаметру пор 0,45 мкм, и, предпочтительно, с нанесенной сеткой.

Мембранные фильтры не должны обладать свойствами, ингибирующими или стимулирующими рост микроорганизмов, и чернила, используемые для нанесения сетки, не должны оказывать влияние на рост бактерий. Если мембранные фильтры поставляются нестерильными, их следует стерилизовать согласно инструкциям изготовителя. Каждая партия мембранных фильтров должна быть проверена на пригодность

для испытания согласно ISO 7704, особенно в связи с тем, что использование мембранных фильтров различных торговых марок может привести к различиям в формировании колоний и их окраски.

5.6 Дезинфицированный пинцет для работы с мембранными фильтрами

6 Культуральные среды и реактивы

Культуральные среды и реактивы готовят согласно ISO 8199 и ISO 11133. Используются ингредиенты однородного качества и химикаты аналитической чистоты (см. примечание); применяются инструкции, приведенные в Приложении В. Альтернативно можно использовать имеющиеся в продаже готовые среды и реактивы, которые соответствуют составам, указанным в Приложении В, строго следуя инструкциям изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ Допускается применять химикаты другой степени чистоты при условии отсутствия различий в результатах испытаний.

Для приготовления культуральных сред используют дистиллированную или деионизированную воду, не содержащую веществ, которые могут ингибировать бактериальный рост в условиях испытания, и соответствующую ISO 3696.

7 Отбор проб

Пробы отбирают и отправляют в лабораторию согласно ISO 19458

8 Процедура

8.1 Подготовка пробы

Подготовка пробы, включающая фильтрацию и инокуляцию на разделительной среде, должна соответствовать инструкциям, данным в ISO 8199. Пробы следует транспортировать и хранить при $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ согласно ISO 19458. В исключительных обстоятельствах пробы можно держать при $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ вплоть до 24 ч до проведения анализа. В этом случае время хранения должно быть указано в протоколе испытания.

8.2 Фильтрация

100 мл пробы, подлежащей анализу, (или другие объемы, например 250 мл для воды, расфасованной в емкости) фильтруют, используя мембранный фильтр (5.5). Минимальный объем для фильтрации составляет 10 мл пробы или ее разведений, чтобы обеспечить равномерное распределение бактерий на мембранном фильтре.

8.3 Инкубация и дифференциация

После фильтрации (8.2) помещают мембранный фильтр на хромогенный агар для колиформных бактерий (ССА) (В.1), не допуская захвата пузырьков воздуха снизу, переворачивают чашку Петри и проводят инкубацию при $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

Исследуют мембранные фильтры и подсчитывают все колонии, дающие положительную реакцию на β -D-галактосидазу (от розового цвета до красного), как презумптивные колиформные бактерии, которые не являются *E. coli*.

Подсчитывают все колонии, дающие положительную реакцию на β -D-галактосидазу и β -D-глюкуронидазу (от темно-синего цвета до фиолетового), как *E. coli*.

Для подтверждения того, что презумптивные колиформные бактерии не являются *E. coli*, должен быть проведен тест на оксидазу. Испытывают предпочтительно все или не менее 10 колоний от розовых до

красных, отобранных, как описано в ISO 8199. Для этого этапа подтверждения могут быть использованы подходящие коммерческие оксидазные тесты¹.

Если коммерческий оксидазный тест не применяется, испытание на оксидазу можно проводить, добавляя две или три капли свежего оксидазного реактива (В.2) на фильтровальную бумагу в чашке Петри. Колонии, которые должны быть подтверждены, переносят на предварительно обработанную фильтровальную бумагу, используя пластиковую или платиновую инокуляционную петлю. При положительной оксидазной реакции появляется темно-синяя окраска в течение 30 с. Она не наблюдается для колиформных бактерий, поскольку они оксидазонегативные.

Если на мембранном фильтре выросло много колоний или если какая-либо презумптивная колония находится рядом с другими колониями, то может возникнуть необходимость в приготовлении субкультур этих презумптивных колоний, чтобы обеспечить проведение оксидазного теста с чистыми культурами. Субкультивирование также необходимо, если презумптивные колонии слишком маленькие для получения надежного результата оксидазного теста. Пересев культуры проводят на неселективный агар (например, В.3) при $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

9 Выражение результатов

По количеству подтвержденных колоний, подсчитанных на мембранном фильтре (8.3), вычисляют количества *E. coli* и колиформных бактерий, присутствующих в 100 мл пробы (или в другом фильтрованном объеме), согласно ISO 8199. Количество колиформных бактерий является суммой всех оксидазонегативных колоний от розового цвета до красного и всех колоний от темно-синих до фиолетовых. К *E. coli* относятся все колонии от темно-синего цвета до фиолетового.

10 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать как минимум следующую информацию:

- a) ссылку на данную часть ISO 9308 (ISO 9308-1:2014);
- b) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- c) результаты, выраженные в соответствии с Разделом 9;
- d) любые частные случаи, наблюдаемые в ходе анализа, и любые операции, не установленные в этой части ISO 9308, которые могли бы повлиять на результаты.

11 Обеспечение качества

11.1 Общие положения

Лаборатория должна иметь четко определенную систему управления качеством для гарантии, что оборудование, реактивы и технические приемы являются подходящими для этого испытания. Использование позитивных и негативных контролей и холостых опытов является частью испытания.

¹ Для оценки рабочих характеристик хромогенного агара для колиформных бактерий, приведенной в Приложении С, использовался оксидазный тест Vactident[®]. Vactident[®] является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является рекомендацией ISO для этого продукта.