МКС 13.060.70

к ГОСТ ISO 16266-2018 Качество воды. Обнаружение и подсчет Pseudomonas aeruginosa. Метод мембранной фильтрации

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Пункт 3. Таблица согласования	–	Российская Федерация	RU	Росстандарт

(ИУ ТНПА № 8-2019)

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ISO 16266—2018

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ

Выяўленне і падлік *Pseudomonas aeruginosa*. Метад мембраннай фільтрацыі

(ISO 16266:2006, IDT)

Издание официальное

Госстандарт
Минск

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протоколом от 30 апреля 2018 г. № 108-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 16266:2006 «Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации» («Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — Method by membrane filtration», IDT).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 4 «Микробиологические методы» технического комитета по стандартизации ISO/TC 147 «Качество воды» Международной организации по стандартизации (ISO).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 25 мая 2018 г. № 32 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 января 2019 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ (с отменой СТБ ISO 16266-2015)

7 Некоторые элементы ISO 16266:2006 могут быть предметом патентных прав. ISO не несет ответственности за определение любых патентных прав

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах.

© Госстандарт, 2018

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Сущность метода 2
5 Разбавители, питательные среды и реактивы 2
6 Оборудование и стеклянная посуда 4
7 Отбор проб 5
8 Методика испытаний 5
9 Представление результатов 6
10 Протокол испытаний 7
11 Данные о ростовых свойствах 7
12 Факторы, препятствующие достоверной оценке 7
13 Обеспечение качества 7
Приложение А (справочное) Дополнительная информация о *Pseudomonas aeruginosa* 8
Приложение В (справочное) Альтернативные среды 8
Библиография 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам 10

Введение

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) — это условно-патогенный для человека микроорганизм, который способен развиваться в воде с очень низким содержанием питательных веществ. В процессе добычи и реализации природной минеральной воды или родниковой воды ни одна из взятых на анализ проб этой воды объемом 250 мл не должна содержать *Pseudomonas aeruginosa* (см. [1] и [2]). Другие виды бутилированной воды, предназначенной для продажи, также не должны содержать *Pseudomonas aeruginosa* в 250 мл пробы (см. [3]). Вода остальных видов, включая воду в плавательных бассейнах и воду для бытового потребления, также может периодически проверяться на содержание *Pseudomonas aeruginosa* в медико-санитарных целях. В этих случаях объем пробы для анализа обычно составляет 100 мл.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa.* Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ
Выяўленне і падлік *Pseudomonas aeruginosa.* Метад мембраннай фільтрацыі

Water quality
Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa.*
Method by membrane filtration

Дата введения 2019—01—01

Внимание! Пользователи настоящего стандарта должны быть ознакомлены с надлежащей лабораторной практикой. Настоящий стандарт не ставит своей задачей рассмотрение в полном объеме проблем безопасности, связанных с его применением, если таковые имеются. Пользователь стандарта берет на себя ответственность за установление соответствующей практики в части соблюдения правил гигиены и требований техники безопасности, а также за обеспечение соответствия всем действующим положениям национальных нормативных актов.

Важно! Испытания, описанные в настоящем стандарте, должны проводиться только обученным соответствующим образом персоналом.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод выделения и подсчета *Pseudomonas aeruginosa* в образцах бутилированной воды с применением мембранной фильтрации. Данный метод может быть применен для анализа воды других видов с низким уровнем фоновой флоры, например воды в плавательных бассейнах или воды, предназначенной для бытового потребления.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения):

ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 5667-1 Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes (Качество воды. Отбор проб. Часть 1. Руководство по составлению программ отбора проб)

ISO 5667-2 * Water quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques (Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по методикам отбора)

ISO 5667-3 Water quality — Sampling — Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples (Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды)

ISO 6887-1 Microbiology of food and feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятичных разведений)

ISO 7704 Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологического анализа)

---

* Заменен на ISO 5667-1:2006.

Издание официальное

ISO 8199 Water quality — General guide to the enumeration of micro-organisms by culture (Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде)

ISO 19458 Water quality — Sampling for microbiological analysis (Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 ***Pseudomonas aeruginosa***: Микроорганизмы, которые размножаются на селективной питательной среде, содержащей цетримид, и вырабатывают пиоцианин, либо микроорганизмы, которые размножаются на селективной питательной среде, содержащей цетримид, дают положительные результаты в тесте на оксидазу, флюоресцируют в ультрафиолетовых лучах с длиной волны (360 ± 20) нм и обладают способностью вырабатывать аммиак из ацетамида.

4 Сущность метода

4.1 Фильтрация

Измеренный объем пробы воды или разведение этой пробы пропускают через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Мембранный фильтр помещают на селективную питательную среду и проводят инкубацию в условиях, предусмотренных для данной питательной среды.

4.2 Подсчет

Количество микроорганизмов, предположительно являющихся *Pseudomonas aeruginosa,* определяют путем подсчета типичных колоний на мембранном фильтре после инкубации. Колонии, вырабатывающие пиоцианин, всегда относят к *Pseudomonas aeruginosa,* в то время как принадлежность прочих флюоресцирующих или окрашенных в красновато-коричневый цвет колоний требует дополнительного подтверждения.

4.3 Подтверждение

Выполняют пересев колоний, видовая принадлежность которых требует подтверждения, с мембранного фильтра на чашки с питательным агаром (см. также приложение В). После инкубации проводят исследование культур, которые первоначально не проявляли флюоресцентных свойств, на оксидазу, а затем проверяют культуры, давшие положительный результат, на выработку флюоресцеина и способность вырабатывать аммиак из ацетамида. Колонии, которые проявили флюоресцентные свойства в начале испытаний, дополнительно проверяют на способность вырабатывать аммиак из ацетамида.

5 Разбавители, питательные среды и реактивы

В процессе приготовления питательных сред и разбавителей используют реактивы аналитической степени чистоты, если не указано иное. Готовят питательную среду, как описано ниже, и добавляют к ней селективные агенты в заданных концентрациях или используют промышленно выпускаемые питательные среды и реактивы, подготавливаемые в соответствии с указаниями изготовителя. Для разведения питательной среды и реактивов используют воду третьей степени чистоты согласно ISO 3696 или воду сопоставимой степени чистоты, не содержащую веществ, которые могут подавлять рост микроорганизмов в условиях, выбранных для испытаний.

5.1 Питательные среды

Для определения *Pseudomonas aeruginosa* применяют питательную среду, описанную ниже.

5.1.1 Основа агаризованной среды *Pseudomonas* агар/агар с цетримидом и налидиксовой кислотой

5.1.1.1 Состав

Желатиновый пептон	16,0 г
Гидролизат казеина	10,0 г
Сульфат калия (безводный) (K_2SO_4)	10,0 г
Хлорид магния (безводный) ($MgCl_2$)	1,4 г
Глицерин	10 мл

Агар	от 11,0 до 18,0 г
Вода (дистиллированная или сопоставимой степени чистоты)	1000 мл

Примечание — Требуемое количество агара зависит от его желирующей способности. При работе с агаром необходимо следовать указаниям изготовителя.

Добавка CN	
Гексадецилтриметиламмоний бромид (цетримид)	0,2 г
Налидиксовая кислота	0,015 г.

5.1.1.2 Приготовление

Растворяют пептон, гидролизат казеина, сульфат калия, хлорид магния и агар в 1000 мл дистиллированной воды (или воды сопоставимой степени чистоты). Добавляют 10 мл глицерина. Доводят смесь до кипения, чтобы добиться полного растворения компонентов, затем стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 мин. Дают питательной среде охладиться до температуры 45 °С–50 °С. Добавку цетримида и налидиксовой кислоты, растворенную в 2 мл стерильной дистиллированной воды, хорошо перемешивают и добавляют к стерильной расплавленной основной среде. После тщательного перемешивания питательной среды ее разливают в стерильные чашки Петри таким образом, чтобы полученная толщина слоя агара составляла не менее 5 мм. Конечный уровень pH застывшей питательной среды должен соответствовать 7,1 ± 0,2 при температуре 25 °С. Залитые чашки, не допуская их высыхания, хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С и используют в течение 1 мес со дня приготовления. Среда может находиться в расплавленном состоянии не более 4 ч. Повторно питательную среду не расплавляют.

5.2 Подтверждающие среды и реактивы

5.2.1 Среда Кинга В

5.2.1.1 Состав

Пептон	20,0 г
Глицерин	10 мл
Фосфат калия однозамещенный (K_2HPO_4)	1,5 г
Сульфат магния семиводный ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 г
Агар	15,0 г
Вода (дистиллированная или аналогичной чистоты)	1000 мл.

5.2.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в нагретой воде. Охлаждают до температуры 45 °С–50 °С и регулируют уровень pH при помощи соляной кислоты или натрия гидроксида таким образом, чтобы он равнялся 7,2 ± 0,2 при температуре 25 °С. Разливают среду по 5 мл в пробирки, закрывают их колпачками и автоклавируют при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 мин. Дают питательной среде в пробирках охладиться и застыть под наклоном.

Хранят среду в темном месте при температуре (5 ± 3) °С и используют в течение 3 мес со дня приготовления.

5.2.2 Питательный бульон с ацетамидом

5.2.2.1 Состав

Раствор А

Фосфат калия двузамещенный (KH_2PO_4)	1,0 г
Сульфат магния безводный ($MgSO_4$)	0,2 г
Ацетамид	2,0 г
Хлорид натрия (NaCl)	0,2 г
Вода (дистиллированная или сопоставимой степени чистоты, не содержащая аммиака)	900 мл.

Растворяют компоненты в воде и регулируют уровень pH раствора при помощи соляной кислоты или гидроксида натрия таким образом, чтобы он соответствовал 7,0 ± 0,5 при температуре 25 °С.

Внимание! Ацетамид оказывает канцерогенное и раздражающее действие. При взвешивании, приготовлении и утилизации данной среды должны быть приняты соответствующие меры безопасности.

Раствор В

Молибдат натрия ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,5 г
Сульфат железа семиводный ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,05 г
Вода	100 мл.

5.2.2.2 Приготовление

Для приготовления питательного бульона с ацетамидом добавляют 1 мл раствора В к 900 мл свежеприготовленного раствора А (5.2.2.1). Непрерывно помешивая, добавляют воду и доводят общий объем раствора до 1 л. Разливают приготовленную смесь по 5 мл в пробирки, закрывают их колпачками и автоклавируют при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 мин. Хранят питательный бульон в темном месте при температуре (5 ± 3) °С и используют не позднее 3 мес со дня приготовления.

5.2.3 Питательный агар

5.2.3.1 Состав

Пептон	5,0 г
Мясной экстракт	1,0 г
Дрожжевой экстракт	2,0 г
Хлорид натрия (NaCl)	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода	1000 мл.

5.2.3.2 Приготовление

Компоненты растворяют в нагретой воде. Стерилизуют раствор в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 мин. Значение pH приготовленной среды после застывания должен быть 7,4 ± 0,2 при температуре 25 °С. Просушивают чашки перед использованием для удаления излишней влаги с поверхности. Залитые чашки хранят в темном месте, не допуская их высыхания, при температуре (5 ± 3) °С и используют в течение 1 мес со дня приготовления.

5.2.4 Реактив для выполнения теста на оксидазу

5.2.4.1 Состав

Тетраметил-*п*-фенилендиамина дигидрохлорид	0,1 г
Вода	10 мл.

5.2.4.2 Приготовление

Растворяют тетраметил-*п*-фенилендиамина дигидрохлорид в воде непосредственно перед использованием; раствор хранят в темном месте. Поскольку данный реактив нестабилен, каждый раз при выполнении анализа приготавливают небольшое количество свежего раствора.

В качестве альтернативы могут использоваться другие доступные, промышленно выпускаемые тесты на оксидазу.

5.2.5 Реактив Несслера

5.2.5.1 Состав

Хлорид ртути ($HgCl_2$)	10 г
Йодид калия (KI)	7 г
Гидроксид натрия (NaOH)	16 г
Вода (не содержащая аммиака)	100 мл.

Растворяют в небольшом количестве воды 10 г $HgCl_2$ и 7 г KI и, помешивая, постепенно добавляют эту смесь к охлажденному раствору, приготовленному из 16 г NaOH и 50 мл воды. Разбавляют раствор водой и доводят его объем до 100 мл. Готовый раствор хранят в боросиликатных стеклянных сосудах с резиновой пробкой вдали от солнечных лучей. Максимальный срок хранения составляет один год.

Внимание! $HgCl_2$ — токсичное вещество. Опасно при проглатывании.

6 Оборудование и стеклянная посуда

Используют стандартное лабораторное оборудование для микробиологических исследований.

6.1 Стеклянная посуда

Всю стеклянную посуду перед применением стерилизуют при температуре (170 ± 5) °С в течение 1 ч в суховоздушном шкафу или при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 минут в автоклаве.

6.2 **Инкубатор,** обеспечивающий поддержание температуры (36 ± 2) °С.

6.3 **Ультрафиолетовая лампа,** длина волны излучения (360 ± 20) нм.

6.4 **Стерильные мембранные фильтры,** номинальный размер пор 0,45 мкм.

Характеристики фильтров подлежат регулярному контролю, как установлено в ISO 7704.

7 Отбор проб

Отбор, хранение, консервацию и обработку проб осуществляют в соответствии с требованиями ISO 5667-1, ISO 5667-3 и ISO 19458.

8 Методика испытаний

8.1 Общие требования

Мембранную фильтрацию осуществляют в соответствии с методикой, описанной в ISO 8199, а приготовление разведений – в соответствии с требованиями ISO 6887-1.

8.2 Мембранная фильтрация

Фильтруют отдельные части пробы воды или части разведения этой пробы через стерильный мембранный фильтр из эфира целлюлозы с номинальным диаметром пор 0,45 мкм. Как установлено в ISO 8199, помещают каждый мембранный фильтр на чашку Петри, содержащую агар с цетримидом и налидиксовой кислотой (5.1), и проверяют отсутствие воздушных пузырей под фильтром.

8.3 Инкубация чашек

Инкубацию чашек Петри проводят при температуре (36 ± 2) °С в течение (44 ± 4) ч в закрытых контейнерах, оберегая их от высыхания.

8.4 Осмотр мембранных фильтров

Рост микроорганизмов на мембранных фильтрах контролируют спустя (22 ± 2) ч и (44 ± 4) ч.

Все обнаруженные колонии, которые дают синюю/зеленую (пиоцианин) окраску, рассматривают как относящиеся к *Pseudomonas aeruginosa*, и выполняют их подсчет.

Осматривают фильтр в ультрафиолетовых лучах. Следует отметить, что продолжительное ультрафиолетовое облучение мембранных фильтров нежелательно, так как в подобном случае колонии могут погибнуть и будет невозможно проследить дальнейший рост микроорганизмов на подтверждающей среде. Выполняют подсчет всех не производящих пиоцианин, но флюоресцирующих колоний как предположительно относящихся к *Pseudomonas aeruginosa* и проверяют их принадлежность при помощи бульона с ацетамидом, как описано ниже.

Выполняют подсчет всех прочих нефлюоресцирующих колоний с красновато-коричневой пигментацией как предположительно относящихся к *Pseudomonas aeruginosa* и проверяют их принадлежность при помощи теста на оксидазу, бульона с ацетамидом и среды Кинга В, как описано ниже. Подсчет колоний по истечении (22 ± 2) ч выполняют на случай чрезмерно быстрого роста и слияния колоний, который может наблюдаться спустя (44 ± 4) ч. По результатам двух подсчетов для вычисления количества *Pseudomonas aeruginosa* в соответствии с разделом 9 используют большее из полученных значений.

В таблице 1 представлен обобщенный порядок выбора колоний и выполнения подтверждающих операций.

Таблица 1 — Операции, необходимые для подтверждения видовой принадлежности колоний, выращенных на агаризованной питательной среде с цетримидом и налидиксовой кислотой

Описание колонии, выращенной на агаре с цетримидом и налидиксовой кислотой	Выработка аммиака из ацетамида	Выделение оксидазы	Флюоресценция на среде Кинга В	Подтверждено присутствие *Pseudomonas aeruginosa*
Синяя/зеленая окраска	НП [a)]	НП	НП	Да
Флуоресцентная окраска (кроме синей/зеленой)	+	НП	НП	Да
Красновато-коричневая	+	+	+	Да
Прочие виды	НП	НП	НП	Нет
[a)] НП — не проверяется.				

8.5 Подтверждение результатов

8.5.1 Питательный агар

Выполняют пересев всех колоний или по возможности как можно большего количества колоний (см. ISO 8199), нуждающихся в подтверждении, с мембранного фильтра, а затем проводят инкубацию в течение (22 ± 2) ч при температуре (36 ± 2) °С. Контролируют посевы на чистоту и подвергают те из них, которые первоначально демонстрировали красновато-коричневую окраску, тесту на оксидазу (см. 8.5.2).

8.5.2 Тест на оксидазу

Помещают две-три капли свежеприготовленного реактива для выполнения теста на оксидазу (см. 5.2.4) на фильтровальную бумагу, находящуюся в чашке Петри.

При помощи платиновой (не никель-хромовой) проволочной петли, пластиковой петли, деревянной или стеклянной палочки распределяют некоторое количество культуры по фильтровальной бумаге. Окрашивание фильтровальной бумаги в насыщенный сине-фиолетовый цвет в течение 10 с рассматривают как положительную реакцию. В качестве альтернативы можно использовать промышленно выпускаемые реактивы для тестов на оксидазу, при этом необходимо соблюдать соответствующие указания изготовителя.

8.5.3 Среда Кинга В

Выполняют пересев описанных в 8.5.1 культур с красновато-коричневой пигментацией, дающих положительные результаты в тесте на оксидазу, на среду Кинга В и инкубируют максимально в течение 5 дней при температуре (36 ± 2) °С [1)]. Ежедневно контролируют их рост в ультрафиолетовых лучах и следят за появлением флюоресценции. Если в указанный пятидневный период было замечено флуоресцентное свечение, фиксируют положительный результат исследования.

8.5.4 Бульон с ацетамидом

Засевают пробирки культурой, полученной согласно 8.5.1, и проводят инкубацию при температуре (36 ± 2) °С в течение (22 ± 2) ч. Добавляют в каждую пробирку одну-две капли реактива Несслера (см. 5.2.5) и проверяют посевы на выделение аммиака, о котором должно свидетельствовать окрашивание содержимого пробирок в зависимости от концентрации в цвет от желтого до кирпично-красного [*].

8.5.5 Подсчет

Подсчитывают все колонии, подтвержденные как *Pseudomonas aeruginosa*, а именно колонии, которые вырабатывают пиоцианин (сине-зеленый пигмент) или демонстрируют положительные результаты в тесте на оксидазу, флуоресцируют в ультрафиолетовых лучах (см. 8.4 или 8.5.3) и обладают способностью вырабатывать аммиак из ацетамида (см. 8.5.4).

Примечание — Флюоресцирующие колонии на первичном мембранном фильтре всегда дают положительные результаты в тесте на оксидазу, соответственно они не нуждаются в дополнительном контроле данного параметра (см. таблицу 1).

9 Представление результатов

Исходя из подсчитанного количества типичных колоний на мембранных фильтрах и с учетом результатов выполнения подтверждающих исследований, определяют подтвержденное количество *Pseudomonas aeruginosa,* содержащееся в заданном объеме воды. Для минеральной, родниковой и других видов бутилированной воды этот объем составляет 250 мл (см. [1], [2], [3]). Для остальных видов воды исследуемый объем обычно равняется 100 мл.

Пример — Если

- P – количество синих/зеленых колоний, заведомо принадлежащих искомому виду;

- F – количество флюоресцирующих колоний;

- R – количество красновато-коричневых колоний;

- n_F – количество флюоресцирующих колоний, проверенных на выделение аммиака;

- c_F – количество флюоресцирующих колоний, давших положительный результат при проверке на выделение аммиака;

[1)] Как правило, достаточно 24 ч.

[*] В качестве альтернативы можно использовать промышленно выпускаемые среды и реактивы, пригодные для этих целей. В этом случае следуют указаниям изготовителя.

- n_R – количество красновато-коричневых колоний, проверенных на выделение аммиака и оксидазы и флюоресценцию на питательной среде Кинга В;

- c_R – количество красновато-коричневых колоний, давших положительные результаты при проверке на выделение аммиака и оксидазы и флюоресцирующих на питательной среде Кинга В, то количество Pseudomonas aeruginosa в исследованном объеме пробы составляет

$$P + F(c_F/n_F) + R(c_R/n_R).$$

Допускается также представление результатов в форме качественной оценки как подтверждение присутствия или отсутствия *Pseudomonas aeruginosa* в исследованном объеме воды.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать следующую информацию:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) все данные, позволяющие полностью идентифицировать пробу;

c) полученные результаты анализа, выраженные в соответствии с требованиями раздела 9;

d) дополнительные наблюдения, сделанные при выполнении анализа, а также сведения обо всех выполненных операциях, не предусмотренных методом или рассматриваемых как необязательные, которые могли оказать влияние на полученные результаты.

11 Данные о ростовых свойствах

При проведении сличительных испытаний в шести лабораториях из пяти стран были получены следующие результаты (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Сличительные испытания для определения ростовых свойств среды *Pseudomonas* агар. Средние показатели относительного выделения (%) различных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* на среде *Pseudomonas* агар по сравнению с питательным агаром после разведения в дистиллированной воде и фильтрации

Штамм	Продолжительность инкубации	%
1	24 ч 48 ч	101,7 100,1
2	24 ч 48 ч	92,6 91,3
3	24 ч 48 ч	104,4 124,8
4	24 ч 48 ч	94,7 91,3

12 Факторы, препятствующие достоверной оценке

При выделении большого числа микроорганизмов, предположительно относящихся к *Pseudomonas aeruginosa,* естественное разрастание колоний может препятствовать их точной количественной оценке.

13 Обеспечение качества

Штамм *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332 может быть использован в качестве положительного контроля, а штамм *E. coli* NCTC 9001 — в качестве отрицательного контроля на любом из этапов исследования.

Приложение А
(справочное)

Дополнительная информация о *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa — это типовой вид микроорганизмов рода *Pseudomonas*.

Он представляет собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, дающие положительную реакцию в тестах на оксидазу и каталазу. Для этих микроорганизмов характерен окислительный метаболизм, что подтверждается результатами теста на среде Хью-Лейфсона; они, как правило, способны восстанавливать нитраты до нитритов и выделять аммиак, разлагая ацетамид. Большинство штаммов (98 %) вырабатывают водорастворимый флюоресцентный пигмент. Также большинство штаммов могут развиваться при температуре 42 °С, а при температуре 4 °С их рост останавливается, что позволяет дифференцировать *Pseudomonas aeruginosa* от *Pseudomonas fluorescens,* которые развиваются при температуре 4 °С, но прекращают рост при температуре 42 °С.

Pseudomonas aeruginosa разжижает желатин, гидролизует казеин и не вызывает гидролиза крахмала. Пигмент пиоцианин (сине-зеленый) вырабатывают более чем 90 % штаммов.

Приложение В
(справочное)

Альтернативные среды

Могут использоваться и другие питательные среды, альтернативные питательному агару, при условии, что они не селективные и не содержат ферментируемых углеводов.

Библиография

[1] Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. *Official Journal of the European Communities,* L229, 1980, pp.
(Директива Совета 80/777/ЕЕС о сближении законодательств государств-членов, касающихся добычи и реализации естественных минеральных вод)

[2] Directive 96/70/EC of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. *Official Journal of the European Communities*, L299, 1996, pp. 26-28
(Директива Совета 96/70/ЕС, изменяющая Директиву Совета 80/777/ЕЕС о сближении законодательств государств-членов, касающихся добычи и реализации естественных минеральных вод)

[3] Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L330, 1998, pp. 32-53
(Директива Совета 98/83/ЕС о качестве воды, потребляемой человеком)

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696-2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля (ISO 3696:1987)
ISO 5667-1	–	*
ISO 6887-1	IDT	ГОСТ ISO 6887-1-2015 Микробиология пищевой продукции и кормов. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений (ISO 3696:1999)
ISO 19458	MOD	ГОСТ 31942-2012 (ISO 19458:2006) Вода. Отбор проб для микробиологического анализа

* Соответствующий государственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык международного стандарта или его официальный экземпляр на английском языке. Официальный перевод данного международного стандарта и/или его официальный экземпляр на английском языке имеются в Национальном фонде ТНПА.

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты.

УДК 628.16.067.1:543.31(083.74)(476) МКС 13.060.70 IDT

Ключевые слова: качество воды, обнаружение *Pseudomonas aeruginosa*, подсчет *Pseudomonas aeruginosa*, метод мембранной фильтрации

Ответственный за выпуск *О. В. Каранкевич*

Сдано в набор 02.07.2018. Подписано в печать 16.07.2018. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,98 Уч.-изд. л. 0,70 Тираж 2 экз. Заказ 973

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/303 от 22.04.2014
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru