ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ISO 7899-2—2018

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков

Часть 2

Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ

Выяўленне і падлік кішэчных энтэракокаў

Частка 2

Метад мембраннай фільтрацыі

(ISO 7899-2:2000, IDT)

Издание официальное

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

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 7899-2:2000 «Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации» («Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method», 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 7899-2-2015)

7 Некоторые элементы ISO 7899-2:2000 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 Оборудование ... 2
6 Питательные среды и реактивы ... 3
7 Отбор проб ... 4
8 Методика испытаний ... 4
9 Обеспечение качества ... 5
10 Представление результатов ... 5
11 Протокол испытаний ... 5
Приложение А (справочное) Дополнительная микробиологическая информация о кишечных энтерококках ... 6
Библиография ... 7
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам ... 8

Введение

Международный стандарт ISO 7899 состоит из следующих частей под общим наименованием «Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков»:

- часть 1. Миниатюризированный метод (наиболее вероятное число) путем инокуляции в жидкостной среде для поверхностных и сточных вод;
- часть 2. Метод мембранной фильтрации.

В настоящем стандарте представлен метод выделения кишечных энтерококков. Методы, описанные в настоящем стандарте, могут применяться для обнаружения и подсчета *Enterococcus faecalis*, *E. faecium, E. durans* и *E. hirae*. Кроме того, иногда могут быть обнаружены другие виды *Enterococcus* и некоторые виды рода *Streptococcus* (а именно *S. bovis* и *S. equinus*). Указанные виды рода Streptococcus не способны выживать в воде в течение продолжительного времени, так что их достоверное количественное определение представляется маловероятным. В целях исследования воды энтерококки могут рассматриваться в качестве индикатора фекальных загрязнений, хотя следует заметить, что некоторые энтерококки, обнаруживаемые в воде, иногда происходят из других сред обитания.

Приложение А настоящего стандарта приведено только для информации.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков
Часть 2
Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ
Выяўленне і падлік кішэчных энтэракокаў
Частка 2
Метад мембраннай фільтрацыі

Water quality
Detection and enumeration of intestinal enterococci
Part 2
Membrane filtration method

Дата введения 2019—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и подсчета кишечных энтерококков в воде с применением мембранной фильтрации. Настоящий стандарт относится в первую очередь к исследованию питьевой воды, воды в плавательных бассейнах и другой прошедшей дезинфекцию воды или чистой воды. Описанный метод может быть также применен для анализа воды любого другого вида, за исключением воды, содержащей значительное количество взвешенных веществ или значительное количество фоновой микрофлоры. В частности, он пригоден для исследования больших объемов воды с малым содержанием кишечных энтерококков.

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 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 5667-1:1980 * 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 5667-2:1991 ** Water quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques (Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по методам отбора проб)

ISO 5667-3:1994 *** Water quality — Sampling — Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples (Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами)

ISO 6887-1:1999 [4*] Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part: 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)

---

* Заменен на ISO 5667-1:2006. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

** Заменен на ISO 5667-1:2006. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

*** Действует ISO 5667-3:2012. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

4* Заменен на ISO 6887-1:2017. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

Издание официальное

ISO 8199:1988 [5*] 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/IEC Guide 2:1996 [6*] Standardization and related activities — General vocabulary (Стандартизация и смежные виды деятельности. Общий словарь)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, установленные в ISO/IEC Guide 2, а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **кишечные энтерококки** (intestinal enterococci): Бактерии, способные восстанавливать 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид до формазана и гидролизовать эскулин при температуре 44 °С на питательной среде (см. 6.3.1 и 6.3.2), описанной в настоящем стандарте.

Примечание — См. также приложение А.

4 Сущность метода

4.1 Фильтрация, инкубация и подсчет

В основу метода подсчета кишечных энтерококков положена фильтрация пробы воды заданного объема через мембранный фильтр, поры которого имеют достаточно малый размер (0,45 мкм), чтобы задерживать бактерии. Затем фильтр помещают на агаризованную селективную среду, содержащую азид натрия (для подавления роста грамотрицательных бактерий) и 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид, бесцветный краситель, восстанавливаемый кишечными энтерококками до красного формазана.

Выращенные типичные колонии окрашены в красный, бордовый или розовый цвет по центру или по всей площади колонии.

4.2 Подтверждение результатов

Если наблюдается рост типичных колоний, необходимо их подтверждение. Для этого мембранный фильтр вместе со всеми колониями переносят на желчно-эскулиновый агар с азидом, подогретый до температуры 44 °С. Кишечным энтерококкам требуется 2 ч, чтобы гидролизовать эскулин на поверхности питательной среды. Конечный продукт 6,7-дигидроксикумарин соединяется с ионами железа (III), образуя вещество цветом от желто-коричневого до черного, диффузно распространяющееся в питательной среде.

5 Оборудование

Всю стеклянную посуду, за исключением одноразовой, которая поставляется в стерильной упаковке, стерилизуют в соответствии с требованиями ISO 8199.

Используют стандартное лабораторное оборудование для микробиологических исследований.

5.1 **Установка для мембранной фильтрации** согласно требованиям ISO 8199.

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

Качество мембранных фильтров может варьироваться в зависимости от марки и даже от конкретной партии. По этой причине необходимо регулярно контролировать их качество, как описано в ISO 7704.

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

5.4 **Инкубатор,** обеспечивающий поддержание температуры (44 ± 0,5) °С.

5.5 **Автоклав,** обеспечивающий поддержание температуры (121 ± 3) °С.

5.6 **Стерильный пинцет.**

5.7 **Нагревательная плита или водяная баня,** рабочая температура 100 °С.

[5*] Заменен на ISO 8199:2005. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

[6*] Заменен на ISO/IEC Guide 2:2004. Однако для однозначного соблюдения требования настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

6 Питательные среды и реактивы

6.1 Основные материалы

Внимание! Селективные среды, о которых идет речь в настоящем стандарте, содержат азид натрия. Поскольку данное вещество обладает высокими токсическими и мутагенными свойствами, должны быть приняты соответствующие меры безопасности во избежание контакта с ним, прежде всего через вдыхание мелкодисперсной пыли в процессе подготовки к использованию промышленно выпускаемых сухих полных питательных сред. Азидсодержащие среды не следует смешивать с сильными органическими кислотами, так как это может привести к образованию токсичного азида водорода (HN_3). Кроме того, растворы, содержащие азид, могут давать взрывоопасные соединения при контакте с металлическими трубами, например со сточным трубопроводом.

Безопасная утилизация азидов возможна при добавлении к ним избыточного количества насыщенного раствора солей азотистой кислоты.

С целью получения единообразных результатов при приготовлении питательной среды используют либо сухую полную питательную среду, либо компоненты одинаково высокого качества и химические реактивы, которым присвоена степень чистоты «чистый для анализа». Азид натрия разлагается с течением времени, поэтому сухая питательная среда имеет ограниченный срок хранения.

Примечание — Использование химических реактивов иной степени чистоты допускается, если доказано, что они обеспечивают получение аналогичных результатов при проведении испытаний.

6.2 **Дистиллированная вода** или иная вода сопоставимой с первой степени чистоты согласно ISO 3696.

6.3 Питательная среда

6.3.1 Среда Сланец-Бартли

6.3.1.1 Основная среда

Триптоза	20,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Глюкоза	2,0 г
Фосфат калия однозамещенный (K_2HPO_4)	4,0 г
Азид натрия (NaN_3)	0,4 г
Агар	от 8 до 18 г [1)]
Вода	1 000 мл

Компоненты растворяют в кипящей воде.

После растворения компонентов смесь продолжают нагревать еще в течение 5 мин.

Охлаждают до температуры 50 °С–60 °С.

6.3.1.2 Раствор ТТХ

2,3,5-трифенилтетразолия хлорид	1 г
Вода	100 мл

Помешивая, растворяют индикаторное вещество в воде.

Стерилизуют, пропуская через фильтр 0,2 мкм.

Раствор оберегают от воздействия света, при появлении розового оттенка — не используют.

6.3.1.3 Полная среда

Основная среда (см. 6.3.1.1)	1 000 мл
Раствор ТТХ (см. 6.3.1.2)	10 мл

Добавляют раствор ТТХ к основной питательной среде, охлажденной до температуры 50 °С–60 °С.

В случае необходимости регулируют уровень pH при помощи раствора карбоната натрия (100 г/л), гидроксида натрия (40 г/л) или соляной кислоты (36,5 г/л) таким образом, чтобы он равнялся 7,2 ± 0,1 при температуре 25 °С.

Разливают питательную среду порциями по 20 мл в чашки Петри диаметром 9 см (или сопоставимыми порциями в чашки другого диаметра) и оставляют для застывания на прохладной горизонтальной поверхности.

Залитые чашки могут храниться в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 2 нед.

[1)] Концентрация зависит от прочности агарового геля.

6.3.2 Желчно-эскулиновый агар с азидом

Триптон	17,0 г
Пептон	3,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Бычья желчь, сухая	10,0 г
Хлорид натрия (NaCl)	5,0 г
Эскулин	1,0 г
Цитрат железа (III)-аммония	0,5 г
Азид натрия (NaN_3)	0,15 г
Агар	от 8 до 18 г [1)]
Вода	1 000 мл

Компоненты растворяют в кипящей воде.

Регулируют уровень pH таким образом, чтобы после стерилизации он равнялся 7,1 ± 0,1 при температуре 25 °С.

Стерилизуют питательную среду в течение 15 мин при температуре (121 ± 3) °С.

Охлаждают до температуры 50 °С–60 °С, разливают по чашкам Петри слоем толщиной от 3 до 5 мм и оставляют для застывания на прохладной горизонтальной поверхности.

Залитые чашки могут храниться при температуре (5 ± 3) °С не более 2 нед.

7 Отбор проб

Отбор проб осуществляют в соответствии с ISO 5667-1 и ISO 5667-3.

8 Методика испытаний

8.1 Пробоподготовка

Подготовку пробы, фильтрацию, а также инокуляцию на питательную среду для выделения выполняют в соответствии с указаниями, предусмотренными ISO 8199 и ISO 6887-1. Предпочтительнее всего приступать к исследованию проб непосредственно после того, как они были отобраны. Если пробы хранятся при температуре окружающего воздуха, то их исследование начинают не позднее чем спустя 6 ч после отбора. В исключительных случаях допускается хранение проб при температуре (5 ± 3) °С в течение не более 24 ч перед исследованием.

Если необходимо разбавить пробу, то такие разбавления проводят в соответствии с требованиями ISO 8199.

8.2 Фильтрация и инкубация

Общая техника выполнения мембранной фильтрации описана в ISO 8199.

Фильтруют то количество воды, которое должно быть исследовано.

Помещают мембранный фильтр на среду Сланец-Бартли (см. 6.3.1).

Проводят инкубацию чашек при температуре (36 ± 2) °С в течение (44 ± 4) ч.

8.3 Подтверждение и подсчет

После инкубации проверяют чашку с посевами на наличие типичных колоний, которые должны иметь красную, бордовую или розовую окраску по центру или по всей площади колонии.

При наличии типичных колоний мембранный фильтр с колониями при помощи стерильного пинцета, не переворачивая, переносят в чашку, содержащую желчно-эскулиновый агар с азидом, предварительно нагретый до температуры 44 °С.

Проводят инкубацию при температуре (44 ± 0,5) °С в течение 2 ч.

Быстро выполняют подсчет колоний в чашке.

Все типичные колонии, цвет области вокруг которых варьируется от желто-коричневого до черного, рассматривают как дающие положительную реакцию и учитывают при подсчете как колонии кишечных энтерококков.

Примечание — Неравномерное распределение колоний или высокий уровень фоновой микрофлоры могут помешать правильно дифференцировать положительные колонии ввиду диффузного окрашивания прилегающих к ним колоний других микроорганизмов.

9 Обеспечение качества

Лаборатория должна иметь четко определенную систему контроля качества, чтобы гарантировать, что для проводимых испытаний применяются подходящие материалы, реактивы и методики.

10 Представление результатов

Расчет результатов осуществляют в соответствии с ISO 8199.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать следующую информацию:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) все данные, позволяющие полностью идентифицировать пробу;

c) количество колоний, подтвержденных как кишечные энтерококки;

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.

Приложение А
(справочное)

Дополнительная микробиологическая информация о кишечных энтерококках

Кишечные энтерококки — грамположительные бактерии, коккоподобной или овальной формы, обычно собранные в цепочки, дают отрицательную реакцию на каталазу, содержат антиген D.

Библиография

[1] ISO 7704:1985 Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологического анализа)

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 3696:1987	IDT	ГОСТ ISO 3696:2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля
ISO 6887-1:1999	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

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

УДК 628.1.03:579.68(083.74)(476) МКС 07.100.20 IDT

Ключевые слова: качество воды, обнаружение кишечных энтерококков, подсчет кишечных энтерококков, 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. 1,74 Уч.-изд. л. 0,46 Тираж 2 экз. Заказ 972

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