ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 6461-2-2016

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Обнаружение
и подсчет спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia)
Часть 2
Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ

Выяўленне
і падлік спор сульфітрэдуцыруючых анаэробаў (clostridia)
Частка 2
Метад мембраннай фільтрацыі

(ISO 6461-2:1986, IDT)

Издание официальное



Госстандарт

Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 628.1.03:579.852.13(083.74)(476) МКС 07.100.20 КП 06 IDT

Ключевые слова: качество воды, сульфитредуцирующие анаэробы (clostridia), метод мембранной фильтрации

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 26 октября 2016 г. № 83

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 6461-2:1986 Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Part 2: Method by membrane filtration (Качество воды. Обнаружение и подсчет спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia). Часть 2. Метод мембранной фильтрации).

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 147 «Качество воды» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2017

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

Издан на русском языке

Введение

Споры сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia) широко распространены в окружающей среде. Они присутствуют в фекалиях человека и животных, в сточных водах и почве. В отличие от Escherichia coli и других колиформных организмов споры способны выживать в воде на протяжении длительного периода времени, так как они более устойчивы к воздействию физических и химических факторов, чем вегетативные формы. Поэтому их присутствие может свидетельствовать о давнем или неравномерном загрязнении. Они также могут быть устойчивы к такому количеству хлора, которое обычно используют при хлорировании воды, и поэтому они пригодны для целей контроля.

ISO 6461 состоит из двух частей:

– часть 1. Метод обогащения в жидкой среде;

– часть 2. Метод мембранной фильтрации.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Обнаружение и подсчет спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia)
Часть 2
Метод мембранной фильтрации

ЯКАСЦЬ ВАДЫ
Выяўленне і падлік спор сульфітрэдуцыруючых анаэробаў (clostridia)
Частка 2
Метад мембраннай фільтрацыі

Water quality
Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia)
Part 2
Method by membrane filtration

Дата введения 2017-06-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и подсчета спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia) методом мембранной фильтрации.

2 Область применения метода

Данный метод может быть применен для испытания любого типа воды, кроме тех случаев, когда существует возможность удерживания твердых частиц на мембране.

3 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 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

ISO 5667-1:2006 * Качество воды. Отбор проб. Часть 1. Руководство по составлению программ и методик отбора проб

ISO 5667-3:2012 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Консервация и обработка проб воды

ISO 7704:1985 Качество воды. Оценка мембранных фильтров, используемых для микробиологического анализа

ISO 8199:2005 Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде

4 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

clostridia: Сульфитредуцирующие, спорообразующие, анаэробные микроорганизмы, которые принадлежат к семейству Bacillaceae рода Clostridium.

5 Сущность метода

Обнаружение спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia) в определенном объеме пробы воды требует проведения следующих этапов.

* Действует взамен ISO 5667-2:1982.

Издание официальное

5.1 Отбор спор

Отбирают споры в пробе путем нагревания в течение времени, достаточного для уничтожения вегетативных форм бактерий.

5.2 Мембранная фильтрация

Фильтруют пробы воды через мембранный фильтр с таким размером пор, который обеспечивает удержание спор бактерий (0,2 мкм) в мембранном фильтре или на нем.

Помещают фильтр на/в специальную селективную питательную среду (железосульфитный агар), инкубируют в анаэробных условиях при температуре (37 ± 1) °С в течение (20 ± 4) ч и (44 ± 4) ч и подсчитывают все колонии черного цвета.

6 Питательные среды и реактивы

6.1 Общие положения

Для улучшения воспроизводимости результатов, приготовления разбавителей и питательных сред рекомендуется использовать сухие основные вещества или сухие полноценные среды. Также могут быть использованы готовые реактивы, имеющиеся в продаже. В таком случае необходимо точно следовать инструкциям производителя.

Химические вещества, используемые для приготовления питательных сред, и реактивы должны быть ч. д. а.

Необходимо использовать дистиллированную или деионизированную воду, не содержащую вещества, которые могут сдерживать рост микроорганизмов в условиях испытания (см. ISO 3696).

Измерение pH должно осуществляться с помощью pH-метра, при этом результат измерения приводят при температуре 25 °С.

Если питательные среды не используются непосредственно после приготовления и если не указано иное, они должны храниться не более 1 мес в темном месте при температуре около 4 °С.

6.2 Железосульфитный агар

6.2.1 Базовая среда (питательный агар)

Состав

Мясной экстракт	3 г
Пептон	10 г
Хлорид натрия (NaCl)	5 г
Агар	15 г
Вода	1000 мл

Приготовление

Растворяют при нагревании все компоненты, доводят объем раствора водой до 1 л, корректируют уровень pH до 7,6 ± 0,1 с помощью раствора гидроксида натрия концентрацией 1 моль/л. Стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Хранят в холодильнике после застывания.

6.2.2 Раствор сульфита натрия (Na_2SO_3)

Растворяют 10 г сульфита натрия в 100 мл воды.

Рекомендуется готовить свежий раствор каждые две недели.

6.2.3 Раствор сульфата железа (II) ($FeSO_4$)

Растворяют 8 г кристаллизованного сульфата железа (II) в 100 мл воды.

6.2.4 Полная среда

Непосредственно перед использованием расплавляют базовую среду (6.2.1) и в каждые 18 мл добавляют 1 мл раствора сульфита натрия (6.2.2) и пять капель раствора сульфата железа (II) (6.2.3).

6.3 Триптоза-сульфит агар (альтернативная среда)

Состав

Триптоза	15 г
Гидролизат соевой муки	5 г

Дрожжевой экстракт	5 г
Пиросульфит натрия	1 г
Цитрат железа (III)-аммония	1 г
Вода	1000 мл

Приготовление

Растворяют при нагревании все компоненты и корректируют уровень pH до 7,6 ± 0,1 при 25 °С.

Разливают по пробиркам в объеме 18 мл. Стерилизуют среду с течение 15 мин при температуре (121 ± 1) °С.

Хранят в холодильнике при температуре от 4 °С до 5 °С.

Срок хранения готовой питательной среды не более 2-х недель.

7 Оборудование и стеклянная посуда

Применяют обычное лабораторное оборудование для микробиологических исследований, а также:

7.1 Стеклянные колбы (колба Эрленмейера, колба с круглым дном или коническая колба) объемом 2 л.

7.2 Пробирки для испытаний, 160 × 16 мм.

7.3 Градуированные пипетки объемом 10 мл, с ценой деления 0,1 мл.

7.4 Мерные пипетки объемом 10 мл.

7.5 Сосуды объемом 1 л.

7.6 Автоклав.

7.7 Водяная баня.

7.8 Установка для мембранной фильтрации.

7.9 Стерильные мембранные фильтры с номинальным размером пор 0,2 мкм.

Примечание – Качество мембранных фильтров может варьироваться в зависимости от производителя или от партии товара. Поэтому рекомендуется на регулярной основе проверять их качество в соответствии с ISO 7704.

7.10 Инкубатор, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С.

7.11 Чашки Петри.

8 Отбор проб

Методы отбора проб указаны в ISO 5667-1 и ISO 8199.

9 Процедура

9.1 Обращение с пробами

Принципы сохранения проб и обращения с ними – в соответствии с ISO 5667-3 и ISO 8199.

9.2 Отбор спор (метод)

Перед испытанием пробу воды греют в водяной бане при температуре (75 ± 5) °С в течение 15 мин, после того как проба достигает указанной температуры. Аналогичный сосуд, содержащий такое же количество воды, как и тестовая проба, используют в качестве контрольного, с тем чтобы контролировать время, необходимое для нагрева. Температура воды в контрольном сосуде может постоянно регистрироваться с помощью термометра.

9.3 Посев и инкубация

Метод мембранной фильтрации – в соответствии с ISO 7704.

По методике, содержащейся в указанном стандарте, фильтруют подходящий объем воды. В случае использования питьевой воды, родниковой или колодезной воды, минеральной воды, морской воды и поверхностной воды, менее загрязненных бактериями clostridia, фильтруют 100 мл воды; для сильно загрязненных и сточных вод фильтруют меньшее количество воды. Объемы менее 10 мл смешивают со стерилизованной водой или разбавителем в объеме от 10 до 100 мл.

Разбавление корректируют таким образом, чтобы полученные в результате колонии черного цвета были четко разделены и могли быть легко подсчитаны.

После фильтрации стерильным пинцетом снимают мембрану и помещают ее лицевой стороной вниз на дно чашки Петри, убедившись, что под фильтром нет пузырьков воздуха. Затем осторожно

выливают 18 мл жидкой полной питательной среды, предварительно охлажденной до температуры около 50 °С, на мембрану, поддерживая ее стерильным пинцетом. После создания указанного слоя среды посевы инкубируют в анаэробных или других условиях, обеспечивающих анаэробиоз, при температуре (37 ± 1) °С на протяжении (20 ± 4) ч и (44 ± 4) ч. Если используют анаэробный сосуд или инкубатор, мембранный фильтр может быть помещен на поверхность агара лицевой стороной вверх.

9.4 Учет результатов

Подсчитывают все колонии черного цвета после инкубации в течение (20 ± 4) ч и (44 ± 4) ч.

10 Представление результатов

Результаты представляют в соответствии с ISO 8199.

11 Протокол испытания

В протоколе испытания должен быть указан использованный метод и результаты, выраженные в виде количества спор сульфитредуцирующих анаэробов (clostridia) на объем пробы. Должны быть указаны подсчеты после инкубации в течение (44 ± 4) ч. Если это невозможно, подсчеты после инкубации в течение (20 ± 4) ч должны быть указаны как примерные.

В протоколе испытания должны быть упомянуты детали проведения испытания, не указанные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, а также подробная информация о любых инцидентах, которые могли повлиять на результат испытания.

Протокол испытания должен включать всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы.

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица Д.А.1 – Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
ISO 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	IDT	ГОСТ ISO 3696-2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

Таблица Д.А.2 – Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту другого года издания

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование международного стандарта другого года издания	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
ISO 5667-3:2012 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Консервация и обработка проб воды	ISO 5667-3:2003 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды	IDT	СТБ ISO 5667-3-2012 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды (ISO 5667-3:2003, IDT)

Ответственный за выпуск *Н. А. Баранов*

Сдано в набор 25.01.2017. Подписано в печать 08.02.2017. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,16 Уч.-изд. л. 0,31 Тираж 2 экз. Заказ 346

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