ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 7899-2-2015

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

УДК 628.1.03:579.68(083.74)(476) МКС 07.100.20 КП 06 IDT

Ключевые слова: качество воды, обнаружение кишечных энтерококков, подсчет кишечных энтерококков, 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 14 апреля 2015 г. № 23

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 7899-2:2000 Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method (Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации).

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

Перевод с английского языка (en).

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

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

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

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2015

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

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 2
5 Оборудование 2
6 Питательные среды и реактивы 2
7 Отбор проб 3
8 Методика испытаний 4
9 Обеспечение качества 4
10 Представление результатов 4
11 Протокол испытаний 4
Приложение А (справочное) Дополнительная микробиологическая информация о кишечных энтерококках 5
Библиография 6
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам 7

Введение

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.

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 2015-11-01

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 документы. Для недатированных ссылок применяется последнее издание ссылочного документа (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 6887-1:1999 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 8199:2005 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

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяются термины и определения, установленные в ISO/IEC Guide 2:2004, а также следующие:

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.

* Действует взамен ISO 5667-1:1980 и ISO 5667-2:1991.

Издание официальное

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 грамм-отрицательных 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 мембрану 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 рабочую температуру (36 ± 2) °С.

5.4 Инкубатор, обеспечивающий рабочую температуру (44 ± 0,5) °С.

5.5 Автоклав, обеспечивающий рабочую температуру (121 ± 3) °С.

5.6 Стерильный пинцет.

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

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 химикаты, которым присвоена степень чистоты «чистый для анализа». Азид натрия разлагается с течением времени, поэтому сухая питательная среда имеет ограниченный срок хранения.

Примечание – Использование химикатов иной степени чистоты допускается, если доказано, что они обеспечивают получение аналогичных результатов при проведении испытаний.

6.2 Дистиллированная вода или иная вода сопоставимой степени чистоты, класс 1 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
Калия фосфат однозамещенный (K_2HPO_4)	4,0 г
Азид натрия (NaN_3)	0,4 г
Агар	от 8 до 18 г [1)]
Вода	1000 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 (6.3.1.1)	1000 мл
Раствор ТТХ (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 не более 2 нед при температуре (5 ± 3) °С.

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	1000 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.

[1)] Концентрация зависит от прочности агарового геля.

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 мембрану на среду Сланец-Бартли (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 мембрану 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 – грам-положительные бактерии, обычно образуют цепочки, дают отрицательную реакцию на каталазу, имеют коккоподобную или овальную форму, 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 Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица Д.А.1 – Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам

Обозначение и наименование ссылочного 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
ISO 5667-3:2012 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Консервация и обработка проб воды	IDT	СТБ ISO 5667-3-2012 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды
ISO 6887-1:1999 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	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

Ответственный за выпуск *Н. А. Баранов*

Сдано в набор 29.06.2015. Подписано в печать 13.07.2015. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 0,76 Уч.-изд. л. 0,39 Тираж 2 экз. Заказ 520

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