ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков
Часть 2
Метод мембранной фильтрации

СТ РК 1884-2-2009
(ИСО 7899-2:2000, NEQ)

Издание официальное

**Комитет по техническому регулированию и метрологии
Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан
(Госстандарт)**

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета по техническому регулированию и метрологии и ТК по стандартизации № 71 в области экологической безопасности «Объекты окружающей среды. Промышленные отходы».

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от «17» сентября 2009 г. № 470-од.

3 Настоящий стандарт учитывает требования международного стандарта 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).

Степень соответствия - неэквивалентная (NEQ).

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ **2014 год**
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **5 лет**

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений – в ежемесячных информационных указателях «Государственные стандарты». В случае пересмотра (отмены) или замены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Государственные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

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

Дата введения 2010-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и подсчета кишечных энтерококков с помощью мембранной фильтрации в воде. Настоящий стандарт предназначен для исследования питьевой, дезинфицированной и очищенной воды. Не применим для воды с большим количеством микроорганизмов или взвешенных веществ.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

СТ РК 1.9-2007 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов иностранных государств других нормативных документов по стандартизации в Республике Казахстан.

СТ РК ИСО 5667-1-2006 Качество воды. Отбор проб. Часть 1. Руководство по составлению программ отбора проб.

СТ РК ИСО 8199-2006 Качество воды. Общие требования по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде.

СТ РК ИСО/МЭК 17025-2007 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

ГОСТ 975-1988 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия.

ГОСТ 3118-1977 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 4233-1977 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 4328-1977 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 6709-1972 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 13805-1976 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия.

ГОСТ 17206-1996 Агар микробиологический. Технические условия.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 28498-1990 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.

ИСО 5667-2:1991* Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по составлению методик выборочного контроля.

ИСО 5667-3:2003* Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды.

Издание официальное

* *применяется в соответствии с СТ РК 1.9*

ИСО 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.

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Нормативные документы по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающий эту ссылку.

3 Сущность метода

Подсчет кишечных энтерококков основан на фильтрации определенного объема воды через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Фильтр предварительно обрабатывают азидом натрия и хлоридом 2, 3, 5 трифенилтетразолия помещают на столик аппарата для фильтрации. Азид натрия подавляет рост грамм отрицательных бактерий, а хлорид 2, 3, 5 трифенилтетразолий окрашивает в красный цвет кишечные энтерококки. Если на мембране наблюдаются колонии темно-красного, красного или розового цвета, мембраны с колониями переносят в желчно-эскулиново-азидный агар, подогретый до температуры 44 °С. Кишечные энтерококки гидролизуют эскулин в данной среде за 2 ч. Конечный продукт гидролизации (6, 7 дигидроксикумарин) соединяется с ионами железа (III), приобретая желтовато-черный цвет.

ПРИМЕЧАНИЕ Азид натрия подавляет рост грамм отрицательных бактерий. Хлорид 2,3,5- трифенилтеразолия используют для окрашивания кишечных энтерококков в красный цвет.

4 Аппаратура, материалы, среды, реагенты

- аппарат для мембранной фильтрации со стерильными фильтрами с размером пор 0,45 мкм;
- термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором (36 ± 2) °С;
- термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором (44 ± 0,5) °С;
- автоклав электрический (стерилизатор паровой), с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа;
- весы аналитические высокого класса точности с наибольшим пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,001 г, по ГОСТ 24104;
- секундомер с ценой деления 0,2 с;
- термометр лабораторный с пределами от 0 ^{0}С до 40 ^{0}С по ГОСТ 28498;
- стерильный пинцет;
- баня водяная;
- чашки бактериологические (Петри);
- дистиллированная вода по ГОСТ 6709;
- триптоза;
- дрожжевой экстракт;
- глюкоза по ГОСТ 975;
- двукалиевый фосфат водорода;
- азид натрия;

- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- хлорид 2, 3, 5 трифенилтетразолия;
- желчно-эскулиново-азидный агар;
- карбонат натрия;
- гидроксид натрия, по ГОСТ 4328;
- соляная кислота, по ГОСТ 3118;
- триптон;
- обезвоженная желчь;
- пептон, по ГОСТ 13805;
- хлорид натрия, по ГОСТ 4233;
- эскулин;
- цитрат аммония железа (III).

5 Приготовление питательных сред и реагентов

5.1 Приготовление основы питательной среды

В кипящую воду помещают 20,0 г триптона, 5,0 г дрожжевого экстракта, 2,0 г глюкозы, 4,0 г двукалиевого фосфата водорода, 0,4 г азида натрия, от 8 г до 18 г агара и 1000,0 $см^3$ дистиллированной воды. Как только основа питательной среды приобретет однородный состав, выполняют дополнительный нагрев до температуры 80 °С в течение 5 мин. Затем охлаждают до температуры от 50 °С до 60 °С.

ПРИМЕЧАНИЕ Масса зависит от прочности геля агара.

5.2 Приготовление раствора хлорид 2, 3, 5 трифенилтетразолия

В дистиллированной воде объемом 100 см растворяют 1 г хлорид 2, 3, 5 трифенилтетразолия. Тщательно перемешивают. Раствор помещают в затемненное место и готовят свежий при появления розового оттенка.

5.3 Приготовление питательной среды

К 1000,0 $см^3$ основы питательной среды, охлажденной до температуры от 50 °С до 60 °С приливают 10,0 $см^3$ раствора хлорид 2, 3, 5 трифенилтетразолия. Стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121 ± 3) °С. После стерилизации питательной среды, pH значение среды должно находиться в пределах (7,2 ± 0,1), при температуре 25 °С.

Примечание pH допускается регулировать добавлением растворов гидроокиси натрия (40 $г/дм^3$) или соляной кислоты (36,5 $г/дм^3$).

В чашку Петри приливают 20,0 $см^3$ питательной среды и устанавливают ее на прохладную горизонтальную поверхность. Допускается хранение в темном месте в течение 14 дней при температуре (5 ± 3) °С.

5.4 Приготовление желчно-эскулиново-азидного агара

В кипящую воду объемом 1000,0 $см^3$ помещают 17,0 г триптона, 3,0 г пептона, 5,0 г дрожжевого экстракта, 10,0 г обезвоженной желчи, 5,0 г хлорида натрия, 1,0 г эскулина, 0,5 г цитрата аммония железа (III), 0,15 г азида натрия, от 8 г до 18 г агара. Раствор кипятят до растворения составляющих, затем стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121 ± 3) °С. Охлаждают до температуры 25 °С, и, регулируют значение pH среды до (7,1 ± 0,1) растворами по 6.3.1.3. Повторно стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре (121 ± 3) °С. охлаждают до температуры от 50 °С до 60 °С, наливают 20,0 $см^3$ в чашку Петри и устанавливают на прохладную горизонтальную поверхность. Допускается хранение в темном месте в течение 14 дней при температуре (5 ± 3) °С.

6 Требования к отбору и хранению проб

Отбор пробы выполняется в соответствии с СТ РК ИСО 5667-1, ИСО 5667-2 и ИСО 5667-3.

7 Проведение испытания

7.1 Подготовка образца

Образец профильтровывают и выполняют разбавление в соответствии с СТ РК ИСО 8199 и ИСО 6887-1.

Если образцы хранятся при температуре (25 ± 10) °С, то испытание проводят в течение 6 ч после отбора образца. Если в течение 6 ч испытания не проводятся, допускается хранение пробы при температуре (5 ± 3) °С в течение 24 ч.

7.2 Фильтрация и инкубация

Через мембранный фильтр пропускают определенный объем воды. Фильтр помещают на питательную среду в чашку Петри. Чашку помещают в термостат при температуре (36 ± 2) °С на 44 – 48 ч.

Через 44-48 ч рассматривают все выросшие колонии насыщенного красно-коричневого, красного и розового цвета, включая типичные. При наличии типичных колоний, мембраны с колониями переносят при помощи стерильного пинцета на подготовленный желчно-эскулиново-азидный агар, предварительно подогретый до 44 °С, ставят в термостат с температурой (44 ± 0,5) °С на 2 ч. Затем выполняют считывание результатов. Рассматривают все колонии, окрашенные в желтовато-черный цвет и подсчитывают.

8 Выражение результатов

Расчет результатов проводят в соответствии с СТ РК ИСО 8199.

9 Протокол испытаний

Протокол испытания оформляют согласно требованиям СТ РК 17025.

УДК 628.16:006.35 **МКС 13.060**

Ключевые слова: качество воды, кишечные энтерококки, мембранная фильтрация.

Басуға _____ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 240074

gost.e-ecolog.ru