
Качество воды. Определение ингибиторного воздействия проб воды на испускание света бактериями *Vibrio fischeri* (тест на люминесцентные бактерии).

Часть 1.
Метод с применением свежеприготовленных бактерий

Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) — Part 1: Method using freshly prepared bacteria

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R (Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 11348-1:2007(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe — торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11348-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2007

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Сущность метода	2
4 Мешающие элементы	2
5 Реактивы и материалы	2
6 Аппаратура	4
7 Отбор проб и предварительная подготовка проб	5
8 Выращивание люминесцентных бактерий	6
9 Методика	8
10 Оценка	9
11 Обработка результатов	11
12 Критерии достоверности	13
13 Прецизионность	13
14 Протокол испытания	13
Приложение А (информативное) Метод коррекции цвета	15
Приложение В (информативное) Уровень разведения D. Приготовление серии разведений	18
Приложение С (информативное) Показатели прецизионности	21
Приложение D (информативное) Анализ проб соленой воды со свежеполученными люминесцентными бактериями	22
Библиография	25

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член ISO, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO непосредственно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам электротехнической стандартизации.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 11348-1 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 5, *Биологические методы*.

Настоящее второе издание отменяет и заменяет первое издание (ISO 11348-1:1998), которое прошло технический пересмотр.

ISO 11348 включает следующие части под общим заголовком *Качество воды. Определение ингибиторного воздействия проб воды на световое излучение бактерий Vibrio fischeri (Тест на люминесцентные бактерии)*:

- *Часть 1. Метод с применением свежеприготовленных бактерий*
- *Часть 2. Метод с применением высушенных бактерий*
- *Часть 3. Метод с применением бактерий лиофильной сушки*

Введение

Измерения, установленные в ISO 11348 можно осуществить, используя свежеприготовленные бактерии, а также бактериальные препараты после обычной или сублимационной сушки.

Стандартизованные методы, разработанные и осуществленные DIN Normenausschuss Wasserwesen и ISO/TC 147/SC 5/WG 1 показали, что в определенных случаях такие разные способы подготовки бактерий могут давать отличающиеся результаты, особенно в присутствии тяжелых металлов.

Изменчивая чувствительность вызвана различиями в составе используемых для получения бактерий обычной и лиофильной сушки сред. Эти защитные среды влияют на биологическую доступность ядовитых веществ и/или излучение света люминесцентными бактериями. Это означает, что происхождение и тип препарата необходимо принимать в расчет при интерпретации результатов. Это иногда трудно сделать, поскольку бактерии обычной и лиофильной сушки могут быть получены от разных поставщиков. Это, в свою очередь, может означать, что состав подробно неизвестен и поэтому не может быть истолкован пользователем.

По этой причине в дополнение к измерениям токсичности высушенных бактерий (ISO 11348-2) и бактерий лиофильной сушки (ISO 11348-3), описывается процедура, использующая свежеприготовленные бактерии, в данной части ISO 11348, выполнение которой может толковаться пользователем очень подробно.

Лаборатории, ответственные за результаты, имеют возможность выбора наиболее подходящего метода на основе оценки специалистов и информации об испытываемой пробе воды.

[ISO 11348-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007>

Качество воды. Определение ингибиторного воздействия проб воды на испускание света бактериями *Vibrio fischeri* (тест на люминесцентные бактерии).

Часть 1.

Метод с применением свежеприготовленных бактерий

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ— Пользователи настоящей части ISO 11348 должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий международный стандарт не ставит цели решить все проблемы, связанные с безопасностью, если таковые возникают в процессе его использования. Пользователь сам несет ответственность за установление соответствующих правил безопасности и охраны здоровья, а также за обеспечения соответствия всем регламентным требованиям.

ВНИМАНИЕ— Чрезвычайно важно, чтобы все испытания, проводимые в соответствии с настоящей частью ISO 11348, выполнялись персоналом с соответствующей подготовкой.

1 Область применения

ISO 11348 описывает три метода для определения подавления люминесценции, производимой морскими бактериями *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). В данной части ISO 11348 устанавливается метод с использованием свежеприготовленных бактерий.

Этот метод применим к:

- сточной воде;
- водным экстрактам и продуктам выщелачивания;
- свежей воде (поверхностным и грунтовыми водами);
- морской и солоноватой воде;
- элюатам отстоя (свежей, солоноватой и морской воды);
- внутриводной воде;
- отдельным веществам, растворенным в воде.

2 Нормативные ссылки

Нижеследующие документы являются обязательными для применения данного документа. Для датированных ссылок действительно только указанное издание. В случае недатированных ссылок используется последняя редакция документа, на который дается ссылка (включая все изменения).

ISO 5667-16, *Качество воды. Отбор проб. Часть 16: Руководство по биотестированию образцов*

ISO 5814, *Качество воды. Определение содержания растворенного кислорода. Электрохимический метод с применением зонда*

ISO 7027, *Качество воды. Определение мутности*

3 Сущность метода

Подавление излучения света культурами *Vibrio fischeri* определяют посредством анализа серии. Оно заключается в соединении установленных объемов испытуемой пробы или разбавленной пробы с суспензией люминесцентных бактерий в пробирке.

Критерием испытания является люминесценция, измеренная по прошествии установленного времени контакта, от 15 мин до 30 мин, иногда по выбору 5 мин, принимая во внимание поправочный коэффициент (f_{kr}), который является мерой изменения интенсивности контрольных проб в течение времени экспонирования. Эффект подавления, вызванного пробой воды, можно определить как LID (см. Приложение В) или как EC_{20} и/или значений EC_{50} с помощью серии разведений. (EC = эффективная концентрация).

4 Мешающие элементы

Нерастворимые, плохо растворимые или летучие вещества, или вещества, вступающие в реакцию с водой для разбавления или с суспензией, или изменяющие свое состояние во время периода испытания, могут повлиять на результаты или ухудшить воспроизводимость результатов испытания.

Убыль люминесценции, вызванная поглощением света или рассеянием света, может произойти в случае сильно окрашенных или мутных вод. Такие помехи можно скомпенсировать путем обработки на мутность (7.2) или, например, путем использования двухкамерной трубки коррекции поглощения (см. Приложение А).

ISO 11348-1:2007

Поскольку кислород требуется для биолюминесценции^[6], пробы с высоким потреблением кислорода (и/или низкой концентрацией кислорода) могут вызывать дефицит кислорода и поэтому являются ингибиторными.

Легко биологически разлагающиеся питательные вещества в пробе могут привести к независимому от примесей понижению биолюминесценции^[1].

Пробы, значения рН которых выпадает за диапазон от рН = 6,0 до рН = 8,5, влияют на люминесценцию бактерий^[6],^[7]. Регулирование рН пробы требуется, если токсичный эффект рН не желателен.

Поскольку испытуемые микроорганизмы *Vibrio fischeri* являются морскими бактериями, испытание проб солоноватой воды с помощью стандартного метода часто приводит к стимуляции биолюминесценции, что может замаскировать ингибирующие эффекты (см. Приложение D).

Концентрация соли в исходной пробе, превышающая 30 г/л NaCl, или содержание других веществ, дающих аналогичную осмолярность, может привести, наряду с добавлением соли, требуемым испытанием, к гиперосмотическим эффектам. Результирующая концентрация соли в испытуемых пробах не должна превышать осмолярность раствора концентрацией 35 г/л NaCl, чтобы избежать таких эффектов.

5 Реактивы и материалы

Используют химические реактивы признанной аналитической чистоты. Воду используют дистиллированную или равноценной чистоты.

5.1 Испытуемые бактерии.

Используют штамм люминесцентных бактерий, принадлежащих виду *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Бактериальный штамм можно приобрести в виде имеющихся в продаже высушенных бактерий или бактерий лиофильной сушки, или из коллекции культур, например, в Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Braunschweig, Germany, или NRRL, ARS Culture collection NCAUR, 1815 N, University Street, Peoria, Illinois 61604, USA. Бактериальные суспензии, используемые для измерения токсичности, должны быть свежеприготовленными из культур.

5.2 Раствор хлорида натрия, в качестве разбавителя.

Растворяют 20 г хлорида натрия (NaCl) в воде и доводят до 1 л водой.

5.3 Раствор гидроксида натрия, например, $c(\text{NaOH}) = 1$ моль/л.

5.4 Соляная кислота, например, $c(\text{HCl}) = 1$ моль/л.

Для регулировки pH может потребоваться использовать кислоты или основания низкой или высокой концентрации.

5.5 Раствор для получения свежеприготовленных бактерий.

8,0 г	D(+)-глюкозы моногидрат ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
20,0 г	Хлорид натрия (NaCl)
2,035 г	Гексагидрат хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
0,30 г	Хлорид калия (KCl)
11,9 г	<i>N</i> -(2-Гидроксиэтил)пиперазин- <i>N</i> -(2-этансульфоновая кислота) (HEPES)

Растворяют в воде, перемешивают в течение примерно 30 мин и регулируют pH до $7,0 \pm 0,2$ раствором гидроксида натрия (5.3) или соляной кислоты (5.4). Доводят до объема 1 л водой.

Этот раствор можно хранить порциями при температуре от -18 °C до -20 °C.

5.6 Контрольные вещества.

Готовят следующие исходные растворы контрольных веществ с раствором хлорида натрия (5.2) в качестве растворителя по отдельности, без регулировки pH:

219,8 мг/л	Гептагидрат сульфата цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
9 мг/л	3,5-дихлорофенол ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$) (чистота ≥ 99 %)
22,6 мг/л	Дихромат калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

Эти концентрации примерно вдвое превышают ожидаемые значения EC_{50} для соответствующих контрольных веществ в данной части ISO 11348. Требуемые объемы зависят от установочных параметров испытания.

ПРИМЕЧАНИЕ Можно использовать имеющиеся в продаже химические препараты с определенной концентрацией ZnSO_4 и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (титрисол) для приготовления исходных растворов контрольных веществ.

5.7 Жидкий питательный бульон для предварительных и основных культур.

30 г	Хлорид натрия (NaCl)
6,10 г	Моногидрат дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
2,75 г	Тригидрат гидрофосфата калия ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)

ISO 11348-1:2007(R)

0,204 г	Гептагидрат сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)
0,500 г	Гидрофосфат аммония $[(NH_4)_2HPO_4]$
3 мл	Глицерин
5,00 г	Казопептон
0,50 г	Экстракт дрожжей

Растворяют компоненты в воде и доводят pH до $7,0 \pm 0,2$ раствором гидроксида натрия (5.3) или соляной кислоты (5.4). Доводят до объема 1 л водой. Переносят 50 мл каждого раствора в колбы Эрленмейера (например, 250 мл) и стерилизуют в автоклаве при температуре $121\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 20 мин.

Казопептон и экстракт дрожжей, предлагаемые различными поставщиками, могут отличаться по качеству. При возникновении проблем (например, подавлении роста), рекомендуется приобрести продукт у другого изготовителя.

5.8 Агаризованная среда для исходных культур.

Доводят pH жидкого питательного бульона (5.7) до $pH\ 7,0 \pm 0,2$.

Добавляют 12 г агара на литр и растворяют при небольшом нагревании; стерилизуют и переносят в стерильные чашки Петри.

5.9 Защитная среда.

66 г	D(+)-Глюкозы моногидрат ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)
4 г	Хлорид натрия (NaCl)
2 г	L-Истидин
0,5 г	Альбумин бычьей сыворотки, BSA

Полностью растворяют в воде при температуре примерно $37\text{ }^\circ\text{C}$ и доводят pH до $7,0 \pm 0,2$ при комнатной температуре раствором гидроксида натрия (5.3) или соляной кислоты (5.4) по мере необходимости. Доводят водой до 100 мл.

Разрушение бактериальных клеток при замораживании предотвращают с помощью защитной среды. BSA от разных поставщиков может иметь разное качество. При возникновении проблем рекомендуется сменить изготовителя.

Готовят защитную среду непосредственно перед каждым применением.

6 Аппаратура

6.1 Термоблок с термостатическим контролем, для поддержания испытуемых проб при температуре $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. В процессе одного эксперимента температура не должна отклоняться более чем на $\pm 0,3\text{ }^\circ\text{C}$.

6.2 Водяная баня или термоблок, Чтобы поддерживать объем не менее 12 мл (например, сосуд с реактивом) раствора, приготовленного в 5.5, при температуре $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.

6.3 Люминометр, измерительная ячейка, поддерживаемая при температуре $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, оснащенная подходящими пробирками.

6.4 Пробирки, изготовленные из химически стойкого материала, подходящие к выбранному люминометру вместимостью, которая помогает снимать показания по максимально возможно площади поверхности и вмещается в термоблок (6.1).

- 6.5 рН-метр.
- 6.6 Хронометр.
- 6.7 Поршневые пипетки или пластиковые шприцы, 100 мкл, 500 мкл и 1 000 мкл.
- 6.8 Поршневые пипетки, переменного объема, от 10 мл до 200 мл и от 200 мкл до 5 000 мкл.
- 6.9 Центрифуга с охлаждением.
- 6.10 Магнитный смеситель и магнитная мешалка.
- 6.11 Инкубационный вибратор, для инкубирования колб Эрленмейера.
- 6.12 Автоклав.
- 6.13 Инкубатор.
- 6.14 Спектральный фотометр или фотометр с фильтром и пробирки, с оптической длиной пути 1 см.
- 6.15 Бактериологическая петля для посева культур (или игла).
- 6.16 Кондуктометр.
- 6.17 Морозильная камера, для хранения растворов и суспензий.
- 6.18 Зонд для определения кислорода, в соответствии с ISO 5814.

7 Отбор проб и предварительная подготовка проб

7.1 Отбор проб

Пробы собирают в химически инертные чистые контейнеры в соответствии с ISO 5667-16. Контейнеры наполняют полностью и герметично закрывают. Пробы испытывают, по возможности, быстро после отбора. Там где необходимо, хранят пробы при температуре от 2 °С до 5 °С в темном месте в контейнерах не более 48 ч. До 2 месяцев можно хранить при температуре ≤ -18 °С. Не допускается использовать специальные химические вещества для хранения. Выполняют необходимую регулировку рН и добавляют соль непосредственно перед испытанием.

7.2 Подготовка пробы

Измеряют концентрацию кислорода во всех пробах. Для испытания требуется концентрация кислорода > 3 мг/л. Если концентрация кислорода в неразбавленной пробе меньше 3 мг/л, используют адекватные методы для насыщения пробы кислородом, например, аэрацию или перемешивание.

Измеряют рН всех проб. если значение рН попадает в диапазон от 6,0 до 8,5, в регулировании рН обычно нет необходимости. Регулировка значения рН, однако, может изменять природу пробы. С другой стороны, рН пробы и рН испытываемой партии могут отличаться в результате буферной емкости испытательной среды. Может потребоваться осуществлять испытания на пробах с отрегулированным рН и на пробах с не отрегулированным рН.

Если необходимо, регулируют рН пробы путем добавления либо соляной кислоты (5.4), либо раствор гидроксида натрия (5.3). В зависимости от цели испытания рН можно довести до $7,0 \pm 0,2$ или выше до $(8,5 \pm 0,2)$ с нижним пределом $(6,0 \pm 0,2)$. Выбирают концентрацию соляной кислоты или раствора гидроксида натрия, так чтобы ограничить добавляемый объем до не более 5 % от общего объема.

Добавляют 20 г раствора хлорида натрия на литр пробы воды или к нейтрализованной пробе воды.

Для проб с высокой концентрацией солей измеряют соленость и добавляют такое количество соли, которое необходимо для регулирования осмолярности до 20 г/л NaCl.

Если проба содержит от 20 г/л до 50 г/л эквивалента NaCl, соли добавлять не требуется. Результирующая концентрация соли в испытуемых пробах не должна превышать осмолярности 35 г/л раствора хлорида натрия.

Дополнительную информацию в отношении проб соленой воды см. Приложение D.

Очень мутные пробы необходимо выдержать в течение 1 ч, чтобы дать отстояться, или центрифугировать, например, в течение 10 мин при 5 000g, или фильтровать. Используют для испытания надосадочную жидкость или фильтрат.

8 Выращивание люминесцентных бактерий

8.1 Исходные культуры

Переносят люминесцентные бактерии штамма *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (5.1) в условиях стерильности в чашки Петри, содержащие агаризованную среду для исходных культур (5.8).

Инкубируют в инкубаторе в течение от 2 дней до 3 дней при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Маркируют отдельные люминесцентные колонии при визуальном наблюдении в темноте и после этого держат чашки в холодильнике.

Переносят помеченные колонии в условиях стерильности в другие, свежие чашки после хранения в течение 1 недели – максимум двух недель.

Имеющиеся в продаже флаконы и консервированными бактериями обычно разливают в нестерильных условиях. Для выращивания чистых культур рекомендуется выполнить несколько пересевов отдельных колоний. Чтобы предотвратить генные изменения, можно каждые шесть месяцев открывать новый флакон с консервированными бактериями и использовать эти бактерии.

ПРИМЕЧАНИЕ Люминесценция колоний люминесцентных бактерий может ослабляться при хранении.

8.2 Подготовка предварительных культур

Высевают 50 мл предварительного питательного бульона (5.7) в колбах Эрленмейера (например, вместимостью 250 мл) в условиях стерильности отдельные колонии люминесцентных бактерий исходной культуры возрастом от 2 дней до 3 дней.

Встряхивают в течение $21\text{ ч} \pm 1\text{ ч}$ при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ с периодичностью не менее $180\text{ об}\cdot\text{мин}^{-1}$.

Определяют мутность разведения 1 к 10 культур в растворе хлорида натрия (5.2), например, в формазиновых единицах ослабления (излучения) (FAU) при длине волны 578 нм, в соответствии с ISO 7027.

8.3 Подготовка основной культуры

Засевают 50 мл основного питательного бульона (5.7) в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл соответствующим количеством подготовленной культуры (8.2), чтобы получить расчетную начальную мутность 10 FAU.