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

Часть 2.
**Метод с применением высушенных
бактерий**

*Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples
on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) —*

Part 2: Method using liquid-dried bacteria

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



Ссылочный номер
ISO 11348-2:2007

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 11348-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21405b4f-b0d9-4460-a3d7-67be6d375116/iso-11348-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21405b4f-b0d9-4460-a3d7-67be6d375116/iso-11348-2-2007>



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	3
7 Отбор проб и предварительная подготовка проб	4
8 Проведение анализа	5
9 Оценка	6
10 Обработка результатов	8
11 Критерии достоверности	10
12 Прецизионность	10
13 Протокол испытания	10
Приложение А (информативное) Метод коррекции цвета	11
Приложение В (информативное) Уровень разведения D. Приготовление серии разведений	14
Приложение С (информативное) Показатели прецизионности	17
Приложение D (информативное) Анализ проб соленой воды с высушенными люминесцентными бактериями	18
Библиография	21

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 11348-2 был разработан Техническим комитетом ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитетом SC 5, *Биологические методы*.

Настоящее второе издание отменяет и заменяет первое издание (ISO 11348-2:1998), 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 свежеприготовленных бактерий (ISO 11348-1) и бактерий лиофильной сушки (ISO 11348-3), метод с применением высушенных бактерий описан 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 11348-2:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21405b4f-b0d9-4460-a3d7-67be6d375116/iso-11348-2-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21405b4f-b0d9-4460-a3d7-67be6d375116/iso-11348-2-2007>

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

Часть 2.

Метод с применением высушенных 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 высушенных 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*

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_{kt}), 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).

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 pH которых выпадает за диапазон от pH = 6,0 до pH = 8,5, влияют на люминесценцию бактерий^[6],^[7]. Регулирование pH пробы требуется, если токсичный эффект pH 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. Хранят высушенные бактерии при температуре ≤ -18 °C с учетом рекомендаций поставщика. Бактерии начинают светиться сразу после восстановления влагосодержания и готовы к применению в анализе.

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 высушенных 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	N-(2-Гидроксиэтил)пиперазин-N'-(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.

6 Аппаратура

6.1 Морозильная камера, для хранения консервированных бактерий.

6.2 Термоблок с термостатическим контролем, для поддержания испытуемых проб при температуре 15 °C ± 1 °C. В процессе одного эксперимента температура не должна отклоняться более чем на $\pm 0,3$ °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 (6.2).

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 Водяная баня, поддерживающая температуру $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

6.11 Кондуктометр.

6.12 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 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в темном месте в контейнерах не более 48 ч. До 2 месяцев можно хранить при температуре $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Не допускается использовать специальные химические вещества-консерванты. 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 $> 3\text{ мг/л}$. 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 раствора 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 Проведение анализа

Готовят контрольные пробы согласно 5.6. Анализируют каждую серию бактерий со всеми тремя контрольными веществами. Анализируют не менее одного из трех контрольных веществ параллельно с каждой пробиркой исходной суспензии, оттаянной для анализа.

Пробы готовят в соответствии с 7.2.

Оттаивают высушенные бактерии (исходная суспензия) на водяной бане при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Повторно замороженные исходные суспензии можно использовать только для предварительных испытаний.

Испытуемую суспензию из исходной суспензии готовят в два этапа:

- Добавляют 0,5 мл раствора (5.5) на 100 мкл исходной суспензии в пробирке, поддерживаемой при температуре $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, и гомогенизируют путем осторожного встряхивания пробирки.
- Выдерживают в течение 15 мин.

Пипетируют эту суспензию, например, в реакционный сосуд (емкостью примерно 20 мл) и добавляют 11,5 мл раствора (5.5), поддерживаемого при температуре $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, и гомогенизируют путем осторожного встряхивания реакционного сосуда.

Выдерживают в течение порядка 15 мин.

Готовят первый набор пробирок (6.4), серии разведения пробы, контрольную пробу (5.6) и требуемые контроли (5.2).

Обычная подготовка серии разведения описана в Приложении В. В зависимости от цели анализа и статистических требований в отношении результатов испытания, могут использоваться другие пропорции разведений с концентрациями, распределенными в геометрическом ряду или логарифмическом ряду. Благодаря смешению равных объемов пробы/разбавленной пробы и испытуемой суспензии самая высокая концентрация пробы в анализе составляет, как правило, 50 % собственно пробы. Для испытания практически неразбавленных проб воды (80 % пробы), требуется дополнительная контрольная серия (см. В.2 и Таблицу 1).

Поддерживают пробирки, содержащие раствор хлорида натрия (5.2) для контроля, контрольные пробы (5.6), сами пробы (7.2) и пробы серии разведения (Таблица В.1) при температуре $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выбирают условия испытания, которые гарантируют максимальное отклонение температуры в термоблоке в процессе одного эксперимента не более $\pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для испытаний с равными объемами испытуемой суспензии и пробы пипетируют порции по 500 мкл испытуемой суспензии во второй соответствующий набор пробирок (6.4), поддерживаемых при температуре $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в инкубаторе, с такими же интервалами времени (от 5 с до 20 с), как используются для последующих измерений интенсивности излучения.