
**Качество воды. Подсчет бактерий
Clostridium perfringens. Метод
фильтрации через полупроницаемую
мембрану**

*Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens – Method using
membrane filtration.*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14189:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

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



Ссылочный номер
ISO 14189:2013(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 установку интегрированных шрифтов в 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 Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF 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, просим информировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14189:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2013

Все права сохраняются. Если не задано иначе, 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 офиса ISO по адресу, указанному ниже, или членом ISO в стране регистрации пребывания.

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 Термины и определения	1
4 Сущность метода	2
5 Аппаратура и стеклянная посуда	2
6 Питательные среды и реактивы	3
6.1 Основные материалы	3
6.2 Питательные среды	3
7 Отбор проб	3
8 Проведение анализа	3
8.1 Транспортирование и хранение пробы	3
8.2 Предварительная тепловая обработка для отбора спор	4
8.3 Разбавление пробы	4
8.4 Фильтрация	4
8.5 Инкубация и исследование	4
8.6 Подтверждение наличия колоний <i>Clostridium perfringens</i>	5
9 Обработка результатов	5
10 Протокол анализа	5
11 Подтверждение качества	6
Приложение А (нормативное) Состав и приготовление питательных сред и реактивов	7
Приложение В (информативное) Параметры метода	9
Библиография	12

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) всемирная федерация национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по подготовке международных стандартов обычно ведется через технические комитеты ISO. Каждый комитет-член ISO, проявляющий интерес к тематике, по которой учрежден технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, государственные и негосударственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки данного документа, и процедуры, предусмотренные для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC Directives, Part 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, требуемые для различных типов документов ISO. Проект данного документа был разработан в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC Directives, Part 2. www.iso.org/directives.

Необходимо обратить внимание на возможность того, что ряд элементов данного документа могут быть предметом патентных прав. Международная организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке документа, будут указаны во Введении и/или в перечне полученных ISO объявлениях о патентном праве. www.iso.org/patents.

Любое торговое название, использованное в данном документе, является информацией, предоставляемой для удобства пользователей, а не свидетельством в пользу того или иного товара или той или иной компании.

Для пояснения значений конкретных терминов и выражений ISO, относящихся к оценке соответствия, а также информация о соблюдении Международной организацией ISO принципов ВТО по техническим барьерам в торговле (ТБТ), см. следующий унифицированный локатор ресурса (URL): [Foreword - Supplementary information](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638eb653f4/iso-14189-2013)

Технический комитет, несущий ответственность за данный документ, ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитет SC 4, *Микробиологические методы*.

Введение

Бактерии *Clostridium perfringens* широко известны как полезный индикатор фекального загрязнения. В кишечнике животных и человека эти грамм -положительные бактерии образуют споры, стойкие к нагреванию по сравнению с вегетативными (беспоровыми) клетками (бактерий). Бактерии *C. perfringens* в кишечнике существуют одновременно как споры и как вегетативные клетки; споры также обнаружены в пробах окружающей среды (экологических пробах). Споры *C. Perfringens* живут в воде месяцами, гораздо дольше, чем вегетативные бактерии – фекальный индикатор, и, поэтому, их присутствие может свидетельствовать о давнем или средней давности фекальном загрязнении. Мониторинг *C. Perfringens* показал свою полезность при оценивании качества водных ресурсов и проверке стадий очистки воды с целью установления эффективности водоочистных сооружений. Споры не всегда можно инактивировать обычными мерами дезинфекции (например, хлорированием).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14189:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

Качество воды. Подсчет бактерий *Clostridium perfringens*. Метод фильтрации через полупроницаемую мембрану

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Пользователи данного международного стандарта должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий стандарт не преследует цели рассмотреть все вопросы, связанные с безопасностью, если они возникают при его использовании. Пользователь сам несет ответственность за разработку соответствующих правил техники безопасности и охраны здоровья, а также за обеспечение соответствия условиям национальных регламентов.

ВНИМАНИЕ! – Самое главное, чтобы анализ в соответствии с настоящим международным стандартом выполнялся обученным персоналом.

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод подсчета вегетативных клеток и спор бактерий *Clostridium perfringens* с помощью фильтрации через полупроницаемую мембрану в пробах воды, предназначенной для потребления человека. В то же время, этот метод можно применять ко всем типам проб воды, при условии, что они не содержат твердые частицы или коллоидный материал, который мешает фильтрации.

2 Нормативные ссылки

Нижеследующие нормативные документы являются обязательными для применения настоящего документа. В отношении датированных ссылок действительными являются только указанные издания. В отношении недатированных ссылок применимо последнее издание ссылаемого документа, включая любые изменения к нему.

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

ISO/TS 11133-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории*

ISO 19458, *Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа*

ISO/IEC Guide 2:2004, *Стандартизация и родственная деятельность. Общий словарь*

3 Термины и определения

В данном документе применяются термины и определения, данные в ISO/IEC Guide 2, а также следующие:

3.1

презюмтивные клостридии перфингес **presumptive *Clostridium perfringens***

бактерии, колонии которых, выращенные на триптоза-сульфитном агаре с циклосерином (TSC –агар) имеют все оттенки от серого до желто-коричневого и черного цвета, даже если цвет слабовыраженный, после анаэробной инкубации при температуре $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч

ПРИМЕЧАНИЕ 1 к статье В отличие от колоний, выращенных непосредственно на агаровой среде, колонии на мембране не всегда демонстрируют явное почернение, поэтому учитывают и бледные колонии.

3.2 подтвержденные *клостридии перфингес* **confirmed *Clostridium perfringens***

бактерии, характеристические колонии которых выращены на триптоза-сульфитном агаре с циклосерином (TSC –агар) и обладают кислотно-фосфатазным ферментом

4 Сущность метода

Измеренный объем пробы или ее разведения фильтруют через мембрану с размером пор 0,45 мкм, достаточного для удерживания пор *клостридии*. Мембрану инкубируют на избирательной/дифференциальной агаровой (на триптоза-сульфитном агаре с циклосерином) среде в анаэробных условиях при температуре $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч. Колонии *C. perfringens* обычно от серого до желто-коричневого и черного цвета, как результат восстановления сульфита до сульфида, который реагирует с солью трехвалентного железа в питательной среде. Характеристические колонии подсчитывают и проводят подтверждающие тесты. Результат вычисляют как число колоний на объем пробы. Если требуется только подсчет спор, пробу сначала подвергают предварительной обработке при температуре $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$, чтобы инактивировать вегетативные бактерии.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Питательная среда содержит циклосерин как селективное вещество для подавления роста бактерий рода *Bacillus*.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Инкубация при температуре 44°C увеличивает избирательность теста для *C. perfringens*.

5 Аппаратура и стеклянная посуда

За исключением стеклянной или пластиковой посуды однократного применения, поставляемых в стерильной форме, посуду стерилизуют в соответствии с требованиями ISO 8199.

Обычное микробиологическое оборудование и в частности:

5.1 Установка для фильтрации через полупроницаемую мембрану, в соответствии с ISO 8199.

5.2 Стерильные фильтровальные воронки

Используют воронки, которые либо поставляются в стерильной форме, либо стерилизуют их в соответствии с требованиями ISO 8199. Альтернативно допускается использовать металлические воронки, которые стерилизуют в пламени перед применением.

ПРИМЕЧАНИЕ Для данного метода недостаточно стерилизовать воронки кипячением.

5.3 Стерильные мембранные фильтры, номинальный размер пор 0,45 мкм.

Качество мембранных фильтров может быть разным в зависимости от марки или даже от партии. Поэтому рекомендуется регулярно проверять качество.

5.4 Инкубаторы, обеспечивающие поддержание при температурах $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ и $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.5 Водяная баня (необязательно), обеспечивающая поддержание при температуре $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ и оснащенная средством для циркуляции воды.

5.6 Автоклав, обеспечивающий поддержание при температуре $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$.

5.7 Стерильный пинцет

5.8 Анаэроустат, или аналогичное оборудование.

5.9 Анаэробная газогенераторная система, для создания атмосферы, состоящей приблизительно на 90 % из водорода и на 10 % из двуокиси углерода.

6 Питательные среды и реактивы

6.1 Основные материалы

Для единства результатов при приготовлении сред используют компоненты одинакового качества и химические реактивы признанной аналитической чистоты. Для приготовления сред используют воду, дистиллированную в стеклянном сосуде, или деионизированную воду равноценной чистоты, как установлено для воды класса 3 по ISO 3696^[1].

Альтернативно используют имеющуюся в продаже обезвоженную полную среду и реактивы, приготовленные и используемые по инструкциям изготовителя.

Можно пользоваться химическими реактивами других классов, при условии получения таких же результатов.

6.2 Питательные среды

См. Приложение А.

6.2.1 Триптоза-сульфитный агар с цикloserином (TSC -агар), Ссылки [6][11][12]

См. А.1.

6.2.2 Основа - кровяной агар или колумбийский агар или другой подходящий богатый питательными веществами агар

См. А.2.

6.2.3 Реактив кислотная фосфатаза

См. А.3.

7 Отбор проб

Осуществляют отбор проб в соответствии с ISO 19458.

8 Проведение анализа

8.1 Транспортирование и хранение пробы

Исследование начинают, как только пробу отобрали, предпочтительно в тот же самый рабочий день. Пробы следует охлаждать в процессе транспортирования в идеале до температуры $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$. Рекомендуется максимальная продолжительность хранения проб, включая транспортирование, для вегетативных бактерий 12 ч и для спор 24 ч. Продолжительность хранения проб, включая транспортирование, не должно превышать 18 ч для вегетативных бактерий и 72 ч для спор.

8.2 Предварительная тепловая обработка для отбора спор

Если требуется подсчитать только споры, тщательно перемешивают пробу и затем нагревают ее до (60 ± 2) °C на водяной бане в течение (15 ± 1) мин. Нагретый объем должен быть больше, чем объем, подлежащий анализу. За температурой необходимо следить, поместить соответствующий термометр в контрольную склянку такого же размера, как и склянка с пробой, и содержащую такой же объем воды при той же самой начальной температуре, как подлежащая обработке проба. Время, необходимое для достижения температуры (60 ± 2) °C, не должно превышать 15 мин и может быть сведено к минимуму посредством циркуляции воды в водяной бане, максимально увеличивающей теплообмен.

8.3 Разбавление пробы

Испытательный объем пробы или ее разведения – после тепловой обработки, если требуется – следует выбрать для получения, если возможно, от 10 до 80 колоний на мембрану диаметром от 47 мм до 50 мм. Испытательные объемы или разведения следует готовить в соответствии с ISO 8199.

8.4 Фильтрация

Для общего описания техники фильтрации через полупроницаемую мембрану см. ISO 8199.

Фильтруют отмеренный объем воды. Этот объем должен соответствовать объему исследуемой воды. Для воды, предназначенной для потребления человеком, обычно фильтруют объем 100 мл. Записывают профильтрованный объем.

После фильтрации помещают мембрану лицевой стороной вверх, place the membrane на чашку с TSC-агаром, следя за тем, чтобы под фильтр не попали пузырьки воздуха.

ПРИМЕЧАНИЕ Альтернативно можно использовать тонкий слой (примерно от 5 мл до 10 мл на чашку Петри диаметром 90 мм) расплавленного TSC-агара (доведенного до равновесного состояния на водяной бане температурой (45 ± 1) °C) в качестве укрывающего слоя на мембране. Перед анаэробной инкубацией дают агару застыть. Эта процедура может способствовать почернению колоний. Необязательно добавлять циклосерин в TSC-агар для укрывающего мембрану слоя. В то же время, получение чистых культур для подтверждающего теста может оказаться более трудоемким.

Поскольку споры *C. perfringens* являются более теплостойкими, должны использоваться стерильные воронки (5.2). Помещение в кипящую водяную баню между пробами может оказаться недостаточным для инактивации спор. Допускается стерилизация металлических воронок в пламени. Для различных объемов одной и той же пробы воронку можно использовать повторно, при условии, что сначала фильтруются минимальные объемы пробы.

8.5 Инкубация и исследование

Время между помещением мембраны на поверхность TSC-агара и начала инкубации должно быть максимально коротким и не превышать 1 ч.

Инкубируют чашки с фильтрами, в анаэробных условиях при температуре (44 ± 1) °C в течение (21 ± 3) ч в перевернутом виде, чтобы избежать влияния водного конденсата.

После инкубации считают presumptивные *C. perfringens* путем подсчета всех колоний от серого до желто-коричневого и черного цвета, даже если окрашивание слабое на среде TSC при наблюдении колоний либо поверх мембранного фильтра или под ним.

Поскольку черный цвет колоний быстро слабеет и, в конечном счете, исчезает, чашки следует обсчитывать в течение 30 мин после завершения анаэробной инкубации. Если используют несколько анаэроустатов, чашки следует проверять в них по очереди, от одного к другому, или порциями, если инкубацию проводили в анаэробном инкубаторе.

8.6 Подтверждение наличия колоний *Clostridium perfringens*

8.6.1 Общие положения

Рекомендуется для методов фильтрации через мембрану в анализе воды при результате подсчета от 1 до 10 колоний все колонии подвергать тесту на подтверждение наличия предполагаемых колоний, а при результате подсчета более 10 колоний, не менее 10 из них отобрать случайным образом для теста на подтверждение наличия.

Для подтверждения при результате подсчета от 1 до 10 колоний пересевают все колонии и не менее 10 колоний, отобранных случайным образом на чашках с кровяным агаром, при результате подсчета выше 10 колоний. Когда это непрактично, все типичные колонии должны быть изучены по отдельным участкам мембраны.

Если кровяного агара не имеется, для посева для основы питательной среды можно использовать колумбийский агар или агар, богатый питательными веществами (например, триптон-соевый агар).

Инкубируют в анаэробных условиях в инкубаторе при температуре $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

8.6.2 Тест кислотной фосфатазой

Колонии, выращенные в анаэробных условиях на чашках с кровяным или питательном агаре, распределяют равномерно на фильтровальной бумаге и на колонии капают две-три капли кислотной фосфатазы. Пурпурный оттенок, проявляющийся в течение от 3 мин до 4 мин считается положительной реакцией.

8.6.3 Интерпретация

C. perfringens дают колонии от серого до желто-коричневого и черного цвета на TSC -агаре, даже если цвет слабый, и обладают кислотной фосфатазой.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

9 Обработка результатов

По общему числу колоний и числу подтвержденных колоний вычисляют количества презумптивных *C. perfringens* и количество спор, если необходимо, присутствующих в 100 мл профильтрованного объема пробы в соответствии с ISO 8199.

Там где требуется, следует оценить изменчивость результатов анализа согласно ISO 29201^[3].

10 Протокол анализа

Протокол испытаний должен включать, по крайней мере, следующую информацию:

- использованный метод анализа, наряду со ссылкой на данный международный стандарт (ISO 14189:2013);
- все детали, необходимые для полной идентификации пробы;
- число колоний презумптивных *C. perfringens* (необязательно, в зависимости от цели исследования);
- число колоний, подтвержденных как *C. perfringens*;
- указание, что результат представляет общее число *C. perfringens* (вегетативных клеток и спор) или только число спор;