
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO
14189**

*(проект, ВУ,
первая редакция)*

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Подсчет бактерий *Clostridium perfringens*

Метод мембранной фильтрации

(ISO 14189:2013, IDT)

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4.

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № ____ от ____ _____ 20__ г.)

За принятие стандарта проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ISO 3166) 004—97 | Код страны по МК (ISO 3166) 004—97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|---|------------------------------------|---|
| | | |

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 14189:2013 «Качество воды. Подсчет бактерий *Clostridium perfringens*. Метод мембранной фильтрации» («Water quality — Enumeration of *Clostridium perfringens* — Method using membrane filtration», IDT)

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

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

ГОСТ ISO 14189

(проект, ВУ, первая редакция)

Введение

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 клетками. *C. perfringens* в кишечнике существуют одновременно как споры и как вегетативные клетки, при этом споры, также обнаружены в пробах, взятых из окружающей среды. Споры *C. Perfringens* выживают в воде месяцами, гораздо дольше, чем вегетативные клетки, которые служат индикатором фекального загрязнения, и, поэтому, их присутствие может свидетельствовать о давнем или средней давности фекальном загрязнении. Мониторинг *C. Perfringens* показал свою полезность при оценке качества водных ресурсов и проверке стадий очистки воды с целью установления эффективности водоочистных сооружений. Споры не всегда можно инактивировать обычными мерами дезинфекции (например, хлорированием).

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Подсчет бактерий *Clostridium perfringens*
Метод мембранной фильтрации
Water quality
Enumeration of *Clostridium perfringens* for microbiological examination
Method using membrane filtration

Дата введения — _____

Предостережение. Применение настоящего стандарта возможно после ознакомления с требованиями установившейся лабораторной практики. Настоящий стандарт не преследует цели рассмотреть все вопросы безопасности, связанные с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности, охраны труда и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь.

Внимание. Необходимо, чтобы испытания в соответствии с настоящим стандартом проводились квалифицированным персоналом.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод подсчета вегетативных клеток и спор бактерий *Clostridium perfringens* в пробах воды, предназначенной для потребления человека, с применением мембранной фильтрации. Данный метод может быть применен к пробам любого вида воды, при условии, что они не содержат твердые частицы или коллоидные вещества, которые могут затруднять фильтрацию.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ISO 8199, Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture (Качество воды. Общее руководство по подсчету микроорганизмов, выращенных методом посева на питательной среде)

ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общее руководство по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории)

ISO 19458, Water quality — Sampling for microbiological analysis (Качество воды. Отбор проб для микробиологического анализа)

ISO/IEC Guide 2:2004 Standardization and related activities — General vocabulary (Стандартизация и смежные виды деятельности. Общий словарь)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют термины и определения, установленные в ISO/IEC Guide 2, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 презумптивные клостридии перфрингенс (presumptive *Clostridium perfringens*): Бактерии, колонии которых, выращенные на триптозо-сульфит-цикосериновом агаре, имеют все оттенки, в том числе слабовыраженные, от черного или серого до желто-коричневого цвета, после анаэробной инкубации при температуре $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч.

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

ГОСТ ISO 14189

(проект, ВУ, первая редакция)

3.2 подтвержденные клостридии перфрингенс (confirmed *Clostridium perfringens*): Бактерии, с характерными колониями, которые выращены на триптозо-сульфит-цикосериновом агаре и обладают активностью кислой фосфатазы.

4 Сущность метода

Отмеренный объем пробы, или ее разведения, пропускают через мембрану с размером пор 0,45 мкм, достаточным для удерживания спор клостридии. Мембрану помещают на дифференциально-селективную среду (триптозо-сульфит-цикосериновый агар) и проводят инкубацию в анаэробных условиях при температуре $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч. *C. Perfringens*, как правило, образуют колонии от черного или серого до желто-коричневого цвета, как результат восстановления сульфита до сульфида, который реагирует с солью трехвалентного железа в питательной среде. Типичные 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 клетки.

Примечание 1 – Питательная среда содержит цикloserин как селективное вещество для подавления роста бактерий рода *Bacillus*.

Примечание 2 – Инкубация при температуре $44 ^\circ\text{C}$ увеличивает селективность теста для *C. perfringens*.

5 Оборудование и стеклянная посуда

Одноразовая и пластиковая посуда поставляется в стерильном виде, стеклянную посуду стерилизуют в соответствии с требованиями ISO 8199.

Используют стандартное лабораторное оборудование для микробиологических исследований, в том числе указанное ниже:

5.1 Оборудование для мембранной фильтрации, в соответствии с ISO 8199.

5.2 Стерильные фильтровальные воронки

Используют воронки, которые поставляются в стерильном виде, или стерилизуют в соответствии с требованиями ISO 8199. Допускается использовать металлические воронки, которые стерилизуют в пламени перед применением.

Примечание – Для метода, описанного в настоящем стандарте, недостаточно стерилизовать воронки кипячением.

5.3 Стерильные мембранные фильтры с номинальным размером пор 0,45 мкм.

Качество мембранных фильтров может отличаться, как в пределах одной марки, так и в пределах одной партии, и в связи с этим рекомендуется регулярно проверять их качество.

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

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

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

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 получения однородных результатов при приготовлении сред используют компоненты одинакового качества и химические реактивы признанной аналитической чистоты. Для приготовления сред используют дистиллированную или деионизированную воду третьей степени чистоты согласно ISO 3696 [1], или воду сопоставимой степени чистоты.

В качестве альтернативы могут быть использованы среды и реактивы, имеющиеся в продаже, приготовленные и используемые в соответствии с инструкциями изготовителя.

Допускается применение химических веществ иной чистоты, при условии получения таких же результатов.

6.2 Питательные среды

См. приложение А.

6.2.1 Триптозо-сульфит-циclosериновый агар (TSC-агар) [6], [11], [12]

См. А.1.

6.2.2 Основа кровяного или колумбийского агара, или другой подходящий питательный агар

См. А.2.

6.2.3 Реактив для определения кислой фосфатазы

См. А.3.

7 Подготовка проб для испытания

Отбор проб осуществляют в соответствии с ISO 19458.

8 Методика проведения испытания

8.1 Транспортирование и хранение пробы

Испытания проводят сразу после отбора проб, предпочтительно в тот же самый рабочий день. Пробы следует охлаждать в процессе транспортирования, желательно до температуры $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Максимальная продолжительность хранения проб, включая транспортирование, составляет 12 ч для вегетативных клеток и 24 ч для спор. Продолжительность хранения проб, включая транспортирование, не должно превышать 18 ч для вегетативных клеток и 72 ч для спор.

8.2 Предварительная тепловая обработка проб, предназначенных для подсчета спор

Если требуется подсчитать только споры, тщательно перемешивают пробу и затем нагревают ее до $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ на водяной бане в течение (15 ± 1) мин. Объем нагреваемой пробы должен быть больше объема, подлежащего анализу. Температуру необходимо контролировать, поместив термометр в контрольную емкость такого же размера, как и емкость с пробой, и содержащую такой же объем воды при той же самой начальной температуре, как подлежащая обработке проба. Время, необходимое для достижения температуры $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$, не должно превышать 15 мин и может быть сведено к минимуму посредством циркуляции воды в водяной бане, максимально увеличивающей теплообмен.

8.3 Разведение пробы

Выбирают необходимый для испытания объем пробы или ее разведения, после тепловой обработки, при необходимости, с расчетом получения, если возможно, от 10 до 80 колоний на мембрану диаметром от 47 до 50 мм. Необходимые для испытания объемы пробы или ее разведения подготавливают в соответствии с ISO 8199.

8.4 Фильтрация

Мембранную фильтрацию осуществляют в соответствии с методикой, описанной в ISO 8199.

Фильтруют отмеренный объем воды. Данный объем должен соответствовать объему анализируемой воды, в котором нормируется отсутствия исследуемых бактерий. Для воды, предназначенной для потребления человеком, фильтруют 100 мл. Записывают отфильтрованный объем.

После фильтрации помещают мембрану лицевой стороной вверх на чашку с TSC-агаром, убедившись, что под мембраной не осталось пузырьков воздуха.

Примечание – В качестве альтернативы, допускается использовать тонкий слой (примерно от 5 до 10 мл на чашку Петри диаметром 90 мм) расплавленного TSC-агара (остуженного на водяной бане при температуре $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$) в качестве укрывающего слоя на мембране. Перед анаэробной инкубацией дают агару застыть. Данная процедура может усилить почернение колоний. Необязательно добавлять циклосерин в TSC-агар для укрывающего мембрану слоя. В то же время, получение чистых культур для проведения подтверждающего теста может оказаться более трудоемким.

Споры *S. perfringens* являются теплостойкими, поэтому должны использоваться стерильные воронки (5.2). Опускание используемых для испытания воронок в кипящую водяную баню может оказаться недостаточным для инактивации спор. Допускается стерилизация металлических воронок в

ГОСТ ISO 14189

(проект, ВУ, первая редакция)

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 чашку с TSC-агаром и началом инкубации должно быть максимально коротким и не превышать 1 ч.

Инкубируют чашки с мембранами, в анаэробных условиях, при температуре $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) ч, в перевернутом виде, чтобы избежать влияния водного конденсата.

После инкубации, осматривают мембрану, помещенную на TSC-агаре, со всех сторон и подсчитывают презумптивные *C. Perfringens*, учитывая все колонии, имеющие оттенки, в том числе слабовыраженные, от черного или серого до желто-коричневого цвета.

Черный цвет колоний быстро слабеет и, в конечном счете, исчезает, в связи с этим, чашки следует проверять в течение не более 30 мин после завершения анаэробной инкубации. Если используют несколько анаэростатов, чашки следует проверять по очереди, от одного к другому, или частями, если инкубацию проводили в анаэробном инкубаторе.

8.6 Подтверждение колоний *Clostridium perfringens*

8.6.1 Общие положения

При анализе пробы воды методом мембранной фильтрации рекомендуется, что все колонии были подтверждены, если количество подсчитанных колоний от 1 до 10. Если количество подсчитанных колоний свыше 10, тогда подлежат подтверждению не менее 10 колоний случайным образом отобранных среди всех подсчитанных.

Подтверждение колоний осуществляется путем пересева на чашки с кровяным агаром всех колоний, если количество подсчитанных колоний от 1 до 10, или не менее 10 колоний, если количество подсчитанных колоний свыше 10. Если такие действия не возможны, тогда все подсчитанные типичные колонии должны быть подтверждены. Если не имеется в наличии кровяной агар, то используют основу колумбийского агара или другого подходящего питательного агара (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 на определение кислой фосфатазы

Колонии, выращенные в анаэробных условиях на чашках с кровяным или питательным агаром, распределяют равномерно на фильтровальной бумаге, затем на колонии капают две-три капли реактива для определения кислой фосфатазы. Пурпурный оттенок, проявляющийся в течение от 3 до 4 мин, считается положительной реакцией.

8.6.3 Интерпретация

C. perfringens образуют на TSC-агаре колонии, имеющие оттенки, в том числе слабовыраженные, от черного или серого до желто-коричневого цвета, в том числе слабовыраженные, и обладают активностью кислой фосфатазы.

9 Представление результатов

В соответствии с ISO 8199, исходя из общего числа колоний и числа подтвержденных колоний, вычисляют число презумптивных *C. perfringens*, и если возможно, число спор, на 100 мл отфильтрованного объема пробы.

При необходимости, следует оценить изменчивость результатов анализа согласно ISO 29201 [3].

10 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

- сведения о методе исследования, а также ссылку на настоящий стандарт;
- все данные, позволяющие полностью идентифицировать пробу;
- число колоний презумптивных *C. perfringens* (необязательно, в зависимости от цели исследования);
- число колоний, подтвержденных как *C. perfringens*;
- сведение о том, что результат представляет общее число *C. perfringens* (вегетативных клеток и спор) или только число спор;

f) все особенности, наблюдавшиеся при проведении анализа, и все операции, не предусмотренные методом, которые могли повлиять на результаты испытания.

11 Контроль качества проведенного испытания

Лаборатория должна иметь четкую систему контроля качества, гарантирующую использование подходящего оборудования, реактивов и методов проведения испытаний. Применение положительного контроля, отрицательного контроля и холостых проб является частью испытания.

Контроль качества питательных сред описан в ISO/TS 11133-1. Для контроля качества количественного анализа используют суспензию *C. perfringens*. Отбирают отфильтрованный объем контрольной пробы, в котором содержится от 10 до 80 КОЕ и обрабатывают также, как и обычную пробу. Сравнивают результат с результатом, полученным на неселективном агаре, таком как кровяной агар. Вместо суспензии *C. perfringens* могут быть использованы стандартные образцы.

Примечание – Учитывая, что питательная среда должна использоваться как можно быстрее, допускается совместить приготовление питательной среды и обработку контрольной пробы с обработкой анализируемой пробы.

В каждую серию анализов включают холостой опыт. Фильтруют 100 мл стерильной воды или другого подходящего разбавителя в соответствии с ISO 8199 и продолжают обрабатывать ее как пробу, но без пастеризации. После инкубации, видимых колоний присутствовать не должно.

Включают подходящий контроль для проверки соответствия анаэробных условий (например, анаэробная индикаторная полоска) в которых выполняется анаэробная инкубация (в анаэростате или в анаэробном инкубаторе).

На этапе подтверждения, с помощью теста на определение кислой фосфатазы, включают известные положительные или отрицательные контрольные штаммы.

При контроле сред и теста на подтверждение, хотя бы один из штаммов *C. perfringens*, приведенных в таблице 1, должен быть использован в качестве положительного контроля.

Bacillus subtilis WDCM 00003 используется в качестве положительного контроля при оценке TSC-агара и анаэробных условий.

Clostridium bifermentans WDCM 00079 используется в качестве отрицательного контроля для теста на подтверждение.

Таблица 1 — Анализ эффективности триптозо-сульфит-цикloserинового агара (TSC-агар) посредством сравнения с неселективной контрольной средой

| Функция | Инкубация | Контрольные штаммы ^{а)} | Контрольная среда | Метод контроля | Критерии | Характерные реакции |
|--------------------|-------------------------------------|---|-----------------------|----------------|--------------------------|-----------------------|
| Производительность | (21 ± 3) ч / (44 ± 1) °C анаэробная | <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007; <i>C. perfringens</i> WDCM 00080; <i>C. perfringens</i> WDCM 00174 | TSA или кровяной агар | Количественный | $PR \geq 0,5$ | Колонии черного цвета |
| Селективность | (21 ± 3) ч / (44 ± 1) °C анаэробная | <i>Bacillus subtilis</i> WDCM 00003 | — | Качественный | Полное ингибирование (0) | — |

^{а)} См. каталог контрольных штаммов, по ссылке <http://www.wfcc.info> для информации о номерах штаммов коллекции культур и контактных данных.

Приложение А (справочное)

Состав и приготовление питательных сред и реактивов

А.1 Триптозо-сульфит-цикloserиновый агар (TSC-агар) [6], [11], [12]

А.1.1 Базовая среда

| | |
|--|--------|
| Ферментативный гидролизат казеина, г | 15 |
| Ферментативный соевый гидролизат, г | 5 |
| Дрожжевой экстракт | 5 |
| Пиросульфит натрия (метабисульфит), безводный (Na ₂ S ₂ O ₅) (CAS No 7681-57-4), г | 1 |
| Цитрат железа(III)-аммония (CAS No.: 1185-57-5), г | 1 |
| Агар, г | 9 – 18 |
| Вода, мл | 1 000 |

Суспендируют ингредиенты в воде при нагревании и частом помешивании до полного растворения. Стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 3) °С в течение 15 мин. Дают остыть до 45 °С – 50 °С. Базовую среду можно хранить при температуре (5 ± 3) °С и использовать в течение 4 недель с момента приготовления. Чтобы приготовить полную среду, прежде чем добавить раствор цикloserина (см. А.1.2), базовую среду расплавляют на водяном пару и охлаждают до температуры 45 °С – 50 °С.

А.1.2 Раствор D-цикloserина

| | |
|------------------------------------|--------|
| D-цикloserин (CAS No.: 68-41-7), г | 4 |
| Вода, мл | до 100 |

D-цикloserин растворяют в воде и фильтруют через мембрану с размером пор 0,2 мкм. В асептических условиях, распределяют в емкости, подходящими объемами с учетом дальнейшего использования, и хранят при температуре (минус 20 ± 5) °С в течение 4 недель с момента приготовления. Допускается хранить при температуре (минус 70 ± 10) °С в течение не более 12 мес.

А.1.3 Полная среда

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Базовая среда (А.1.1), мл | 1 000 |
| Раствор D-цикloserина (А.1.2), мл | 10 |

Раствор D-цикloserина добавляют в расплавленную охлажденную базовую среду, тщательно перемешивают, и разливают в вентилируемые чашки Петри на глубину не менее 5 мм.

Конечный pH среды должен составлять 7,6 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Подготовленные чашки используют как можно быстрее, в тот же день. Если выполнение данного условия не возможно, допускается хранение чашек в анаэробных условиях при температуре (5 ± 3) °С в течение не более 7 дней.

После извлечения из холодильника, невостребованные чашки отбрасывают, в связи с возможным ухудшением эффективности среды. Перед использованием чашки хорошо просушивают.

А.2 Кровяной агар

Используют колумбийский кровяной агар или другую подходящую основу, содержащую 5 % крови (например, кровь лошади, овцы).

Если не имеется в наличии кровяной агар, то для пересева можно использовать другой подходящий неселективный питательный агар (например, основа колумбийского агара или триптон-соевый агар).

А.3 Реактив для определения кислой фосфатазы

| | |
|---|-----|
| 1-нафтил фосфат динатриевая соль (CAS No.: 2183-17-7), г | 0,4 |
| Прочный синий Б соль (О-дианизидин тетраазотированный хлорцинковая соль) (CAS No 14263-94-6), г | 0,8 |
| Ацетатный буфер (pH 4,6 ± 0,2), мл | 20 |

Для приготовления ацетатного буфера растворяют 0,3 мл ледяной уксусной кислоты (CAS No.: 64-19-7) и 0,4 г ацетата натрия (CAS No.: 127-09-3) в деионизированной воде. Доводят объем водой до 1 000 мл. Допускается использовать ацетатный буфер, имеющийся в продаже.

Растворяют все компоненты в ацетатном буфере и дают отстояться в течение (60 ± 5) мин при температуре (5 ± 3) °С до выпадения осадка. Затем фильтруют раствор через складчатый фильтр для удаления осадка. Хранят приготовленный раствор при температуре (5 ± 3) °С в течение не более 2 недель. Перед применением, если опять выпадает осадок, то раствор снова фильтруют .

Примечание 1 – Вместо 1-нафтил фосфат динатриевой соли можно использовать 1-нафтил фосфат моносодиевую соль (CAS No.: 81012-89-7).

ВНИМАНИЕ! — Прочный синий Б соль токсична и может вызвать рак – должны быть приняты соответствующие меры безопасности при взвешивании, приготовлении и удалении отходов данного реактива.

Приложение В (справочное)

Рабочие характеристики

В.1 Рабочие характеристики стандартного метода

В ходе внутрिलाбораторного исследования были определены такие параметры эффективности, как диапазон количественного определения, оптимальность инкубационного периода, неопределенность подсчета и эффективность [2], [10]. Данные представлены в таблице В.1.

Для определения прецизионности метода, описанного в настоящем стандарте, было проведено совместное исследование, в котором приняло участие 12 лабораторий из 11 стран (Австрия, Чехия, Финляндия, Франция, Германия, Венгрия, Ирландия, Португалия, Словакия, Нидерланды, Соединенное Королевство). Пробы (n = 108), состоящие из стандартного образца (диск LENTICULE®, смешанная культура, предоставленные агентством здравоохранения Великобритании). Стандартный образец был предоставлен участникам и использован для приготовления проб воды. В течение трех дней в двухнедельный период был выполнен анализ трех проб в трех параллельных опытах каждая, по стандартному методу. Для проведения анализа на подтверждение наличия презумптивных колоний использовалась одна чашка пробы и один рабочий день, при этом все колонии на этих чашках были проанализированы с помощью теста на определение кислой фосфатазы. Был использован метод для посева с помощью чашек с кровавым агаром. Полученные данные представлены в таблицах В.1 и В.2.

Таблица В.1 — Рабочие характеристики метода

| Характеристика | |
|---|--|
| Внутри-лабораторное исследование | |
| Диапазон количественного определения (колоний на мембране диаметром 47 мм) | От 10 до 80 |
| Робастность времени инкубации | От 18 до 24 ч нет существенной разницы в количествах |
| Расчет неопределенности (RSD) | |
| повторяемость | 0,038 |
| воспроизводимость (внутри-лабораторная) | 0,0348 |
| Идентификация (n=127) | |
| чувствительность (%) | 94 |
| специфичность (%) | 87 |
| процент ложноположительных результатов | 0,10 |
| процент ложноотрицательных результатов | 0,09 |
| селективность | -0,15 |
| эффективность (%) | 92 |
| Межлабораторное исследование | |
| Прецизионность (RSD) ^{a)} | |
| повторяемость (внутри лаборатории) | 0,1676 |
| воспроизводимость внутри лаборатории | 0,1382 |
| воспроизводимость (межлабораторная) | 0,3232 |
| Процент всхожести (%) | >72 |
| ^{a)} В оценки включены изменчивость распределения и операционная изменчивость. | |

В.2 Статистический метод определения параметров прецизионности совместного исследования. Иерархические случайные эффекты в анализе данных: двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA)

Основной принцип заключался в сопоставлении данных с линейной моделью (аддитивный эффект погрешности, без взаимодействия). Результаты подсчетов были преобразованы в десятичную логарифмическую шкалу, чтобы соответствовать предварительным требованиям

нормальности ANOVA. Тест Граббса использовали для выявления выбросов (сомнительный результат для одной лаборатории - $n^{\circ}6$). Ни одного результата исключено не было.

Была использована модель, описанная в ISO Guide 35 [4]. Что касается статистического образа совместного исследования, первоначальная дисперсия «между флаконами» была изменена на дисперсию «между днями».

$$x_{kij} = \mu + \alpha_k + \beta_{ki} + \varepsilon_{kij}$$

где x_{kij} — j -тое измерение i -того дня для k -той лаборатории;

μ — истинное значение;

α_k — погрешность за счет k -той лаборатории;

β_{ki} — погрешность на i -тый день в k -той лаборатории;

ε_{kij} — случайная погрешность измерения.

С практической точки зрения:

– m — оценка μ (согласованное значение также называемое приписанным значением или общим средним);

– S_L^2 — дисперсия за счет межлабораторной погрешности α (систематическая погрешность);

– S_U^2 — дисперсия за счет «эффект-дня» β ;

– S_r^2 — дисперсия погрешности измерения ε .

Пр и м е ч а н и е – Дисперсию воспроизводимости можно оценить следующим образом: $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$.

Все эти параметры были оценены одновременно методом дисперсионного анализа (ANOVA). Было рассмотрено одно и то же число повторных измерений на каждый день испытаний и одно и то же число дней испытаний на лабораторию.

В заключении, формула, приведенная в 6.2 ISO 29201:2012 и используемая для преобразования десятичной логарифмической шкалы в натуральные логарифмы, была применена к оцененной дисперсии. Такое преобразование приводит к выражению неопределенности в относительной шкале (относительная дисперсия: см. также 2.5.2 ISO 29201:2012):

$$u_R^2 = 5,3019s_R^2$$

$$u_U^2 = 5,3019s_U^2$$

$$u_r^2 = 5,3019s_r^2$$

Т а б л и ц а В. 2 — Совместное исследование: Результаты определения параметров прецизионности

| | Дисп. (lg шкала) | u^2 | u |
|---|---------------------|--------|-------|
| Межлабораторная погрешность | 0,0144 | 0,0763 | 27,6% |
| «эффект-дня» | 0,0036 | 0,0190 | 13,8% |
| Погрешность измерения | 0,0053 | 0,0279 | 16,7% |
| Воспроизводимость (между лабораториями) | 0,0197 | 0,1043 | 32,3% |

**Приложение ДА
(справочное)**

**Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов
межгосударственным стандартам**

Таблица ДА.1

| Обозначение ссылочного международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта |
|---|----------------------|---|
| ISO 8199 | — | * |
| ISO/TS 11133-1 | IDT | ГОСТ ISO 11133—2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред» |
| ISO 19458 | MOD | ГОСТ 31942—2012 (ISO 19458:2006) «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа» |
| ISO/IEC Guide 2 | — | * |
| <p>*Соответствующие межгосударственные стандарты отсутствуют. До их принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык международных стандартов. Официальные переводы данных международных стандартов находятся в Национальном Фонде технических нормативных правовых актов Республики Беларусь.</p> <p>Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IDT — идентичные стандарты; - MOD — модифицированные стандарты. | | |

Библиография

- [1] ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)
- [2] ISO/TR 13843:2000 Water quality — Guidance on validation of microbiological methods (Качество воды. Руководство по аттестации микробиологических методов)
- [3] ISO 29201:2012 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods (Качество воды. Изменчивость результатов испытаний и неопределенность измерения методов микробиологического подсчета)
- [4] ISO Guide 35:2006 Reference materials — General and statistical principles for certification (Сертификация стандартных образцов. Общие и статистические принципы)
- [5] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)
- [6] Araujo, M., Sueiro, R.A., Gómez, M.J. & Garrido, M.L. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in ground water samples: comparison of six culture media. *J. Microbiol. Methods*. 2001, 57 pp. 175–180 (Перечисление спор Clostridium perfringens в образцах грунтовых вод: сравнение шести культуральных сред)
- [7] Burger, J.S., Nupen, E.M. and Grabow, W.O.K. Evaluation of four growth media for membrane filtration counting of *Clostridium perfringens*. *Water S.A.* 1984, 10 pp. 185–188 Оценка четырех питательных сред для подсчета с использованием метода мембранной фильтрации *Clostridium perfringens*)
- [8] Hauschild, A.H.W. & Hillsheimer, R. Enumeration of food-borne *Clostridium perfringens* in egg yolk free tryptose-sulphite-cycloserine agar. *Appl. Microbiol.* 1974, 27 pp. 521–526 (Подсчет *Clostridium perfringens* в яичном желтке в агаре без триптоза-сульфита-циклосерина)
- [9] Mead, G.C., Paez de Leon, L. & Adams, B.W. A study of rapid and simplified confirmatory tests for *Clostridium perfringens*. *J. Appl. Bacteriol.* 1981, 51 pp. 355–361 (Изучение экспресс-упрощенных тестов для *Clostridium perfringens*)
- [10] Ryzinska-Paier, G., Sommer, R., Haider, J.M., Knetsch, S., Frick, C., Kirschner, A.K.T. & Farnleitner, A.H. Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water. *J. Microbiol. Methods*. 2011, 87 (2) pp. 189–194 (Тест на определение кислой фосфатазы оказался выше стандартной фенотипической процедуры идентификации штаммов *Clostridium perfringens*, выделенных из воды)
- [11] Sartory, D.P. Membrane filtration enumeration of faecal clostridia and *Clostridium perfringens* in water. *Water Res.* 1986, 20 pp. 1255–1260 (Метод мембранной фильтрации при подсчете фекальных клостридий и *Clostridium perfringens* в воде)
- [12] Sartory, D.P., Field, M., Curbishley, S.M. & Pritchard, A.M. Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of *Clostridium perfringens* in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 27 pp. 323–327 т (Оценка двух питательных сред при подсчете *Clostridium perfringens* в воде с использованием метода мембранной фильтрации)

ГОСТ ISO 14189

(проект, ВУ, первая редакция)

- [13] Sartory, D.P., Waldock, R., Davies, C.E. & Field, A.M. Evaluation of acid phosphatase as a confirmation test for *Clostridium perfringens* isolated from water. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006, 42 pp. 418–424 (Оценка кислой фосфатазы в качестве подтверждения теста на наличие бактерий *Clostridium perfringens*, выделенных из воды)

УДК

МКС 07.100.20

IDT

Ключевые слова: качество воды, бактерии *Clostridium perfringens*, метод мембранной фильтрации

Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

Директор



И.И.Осмола

Заместитель директора
по техническому нормированию,
стандартизации и информатизации



А.Г.Скуратов

Начальник отдела
технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции



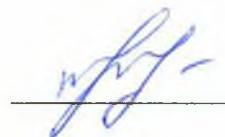
Л.М.Скорина

Начальник сектора
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции



К.А.Родригес

Инженер 2 категории
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции



Е.В.Мотыль