ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53400— 2009 (ИСО 7937:2004)

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод подсчета колоний Clostridium perfringens

ISO 7937:2004
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens — Colony-count technique (MOD)

Издание официальное

БЗ 8—2009/382

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») и Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Российской академии медицинских наук (ГУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН) на основе аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 сентября 2009 г. № 423-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 7937:2004 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета Clostridium perfringens. Метод подсчета колоний» (ISO 7937:2004 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens — Colony-count technique»). При этом в него не включены предисловие, отдельные слова и фразы примененного международного стандарта, которые нецелесообразно применять в национальной стандартизации. Дополнительные слова, фразы, абзацы, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены курсивом.

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (пункт 3.5).

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок, приведены в приложении В

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 *Сущность метода* 2
5 *Разведение, питательные среды* и реактивы 2
6 *Оборудование и лабораторная* посуда 6
7 Отбор проб 6
8 *Подготовка проб* для испытания 6
9 *Проведение определения* 7
10 Обработка результатов 8
11 Протокол испытания 10
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторного испытания 11
Приложение В (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок 14
Библиография 15

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод подсчета колоний Clostridium perfringens

Method microbiology of food and animal feeding stuffs. Method of Clostridium perfringens colonies count

Дата введения — 2011—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов Clostridium perfringens.

Настоящий стандарт применяется при исследовании продуктов, предназначенных для употребления в пищу человеком, и кормов для животных, а также образцов окружающей среды в местах производства и оборота пищевых продуктов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 7218—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие правила микробиологических исследований

ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83) Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **Clostridium perfringens** (C. perfringens): Бактерии, которые образуют типичные колонии (черный осадок, вызванный разложением сульфита до сульфида, который окрашивает колонии в черный цвет) в определенных селективных средах, и которые дают положительные реакции подтверждения, если испытания проводят в соответствии с одним из двух методов, указанных в настоящем стандарте.

3.2 **подсчет *колоний* C. perfringens:** Определение количества способных к росту и подтвержденных бактерий Clostridium perfringens в $см^3$ или г образца при условии проведения испытания в соответствии с методом, указанным в настоящем стандарте.

4 *Сущность метода*

4.1 Посев в чашки Петри определенного количества испытуемой пробы, если исходный продукт жидкий, или установленного количества исходной суспензии.

Следующий посев в чашки Петри проводят в аналогичных условиях с использованием десятикратного разведения испытуемой пробы или исходной суспензии.

Добавляют селективную среду (метод пластинчатого посева) и заливают посев сверху слоем той же среды.

4.2 Анаэробная инкубация чашек при 37 °С в течение (20 ± 2) ч.

4.3 Подсчет типичных колоний.

4.4 Подтверждение ряда типичных колоний и определение количества колоний C. perfringens в г или $см^3$ продукта.

5 *Разведение, питательные среды* и реактивы

В лабораторной практике используют *ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р 51448, ГОСТ Р ИСО 11133-1 и ГОСТ Р ИСО 11133-2* для приготовления, производства, *проверки и применения питательных сред.*

5.1 Разведения

В общем случае *разведения* по *ГОСТ Р ИСО 7218.*

5.2 Сульфит-циклосериновый агар (SC)

5.2.1 Состав *в соответствии с таблицей 1.*

Таблица 1

Состав	Значение показателя
Ферментативный белковый гидролизат, г	15,0
Ферментативный соевый гидролизат, г	5,0
Дрожжевой экстракт, г	5,0
Двунатрий дисульфит безводный ($Na_2S_2O_5$), г	1,0
Железо (III) — аммония цитрат*, г	1,0
Агар, г	От 9,0 до 18,0**
Вода, $см^3$	1000
* Реактив должен содержать не менее 15 % железа (массовая доля). ** В зависимости от гелеобразующей способности агара.	

5.2.1.1 Приготовление среды

Растворяют компоненты среды в горячей воде и *доводят до кипения*. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,6 ± 0,2) при 25 °С.

Разливают среду во флаконы или бутылки соответствующей емкости.

Стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) 15 мин при 121 °С.

Хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более двух недель после приготовления.

5.2.2 Раствор D-циклосерина

5.2.2.1 Состав *в соответствии с таблицей 2.*

Таблица 2

Состав	Значение показателя
D-циклосерин*, г	4,0
Вода, см^3	100
* Используется белый кристаллический порошок.	

5.2.2.2 Приготовление среды

Растворяют D-циклосерин в воде и стерилизуют.

Среду хранят в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С не более четырех недель после приготовления.

5.2.3 Полная среда

Непосредственно перед посевом чашечным методом (см. 9.2) добавляют 1 см^3 раствора D-циклосерина (см. 5.2.2) к каждой порции стерильной расплавленной основы среды объемом 100 см^3 (см. 5.3.1), охлажденной до 44 °С—47 °С.

5.2.4 *Проверка качества* среды (SC)

Определение селективности и качества среды проводят по *ГОСТ Р ИСО 11133-1*. Для проверки характеристик применяют *ГОСТ Р ИСО 11133-2* (таблица В.1).

5.3 Жидкая тиогликолатная среда

5.3.1 Состав *в соответствии с таблицей 3.*

Таблица 3

Состав	Значение показателя
Ферментативный перевар казеина, г	10,0
L-Цистин, г	0,5
D-Глюкоза, г	5,5
Дрожжевой экстракт, г	5,0
Хлорид натрия, г	2,5
Натрия тиогликолат (меркаптоацетат), г	0,5
Агар, г	0,5—2,0*
Диазорезорин, г	0,001
Вода, см^3	1000
* В зависимости от гелеобразующей способности агара.	

5.3.2 Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,3 ± 0,2) при 25 °С.

Среду разливают по 10 см^3 в пробирки 16 × 160 мм и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С.

Перед использованием среда должна быть деаэрирована.

5.3.3 *Проверка качества* тиогликолатной среды

Определение селективности и качества среды проводят по *ГОСТ Р ИСО 11133-1*. Для проверки характеристик применяют *ГОСТ Р ИСО 11133-2* (см. таблицу В.4).

5.4 Лакто-сульфитная среда (LS) (необязательно)

5.4.1 Основа среды

5.4.1.1 Состав *в соответствии с таблицей 4.*

Таблица 4

Состав	Значение показателя
Ферментативный перевар казеина, г	5,0
Дрожжевой экстракт, г	2,5
Хлорид натрия, г	2,5
Лактоза, г	10,0
L-Цистин гидрохлорид, г	0,3
D-Глюкоза, г	5,5
Вода, $см^3$	1000

5.4.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,1 ± 0,2) при 25 °С.

Среду разливают по 8 $см^3$ в пробирки с обратными трубками Дархема и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С.

Среду хранят в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С не более четырех недель после приготовления.

5.4.2 Раствор безводного метабисульфита натрия

5.4.2.1 Состав *в соответствии с таблицей 5.*

Таблица 5

Состав	Значение показателя
Двунатрий дисульфит ($Na_2S_2O_5$) безводный, г	1,2
Вода, $см^3$	100

5.4.2.2 Приготовление

Растворяют двунатрий дисульфит в воде и стерилизуют.

Раствор используют в течение дня.

5.4.3 Раствор цитрата железа (III) — аммония

5.4.3.1 Состав *в соответствии с таблицей 6.*

Таблица 6

Состав	Значение показателя
Железа (III) — аммония цитрат, г	1,0
Вода, $см^3$	100

5.4.3.2 Приготовление раствора

Растворяют цитрат железа (III) — аммония в воде и стерилизуют раствор фильтрованием.

Раствор используют в течение дня.

5.4.4 Полная среда

Перед составлением полной среды ее деазрируют нагреванием и последующим быстрым охлаждением. В случае хранения среды во флаконах с завинчивающимися крышками крышки ослабляют перед нагреванием и затем завинчивают перед охлаждением.

Затем к каждым 8 $см^3$ основы среды (см. 5.4.1) добавляют 0,5 $см^3$ раствора цитрата железа (III) — аммония (см. 5.4.3) и 0,5 $см^3$ раствора двунатрия дисульфита (см. 5.4.2)

Среда используется в течение дня.

5.5 Подвижная нитратная среда (необязательно)

5.5.1 Состав *в соответствии с таблицей 7.*

Таблица 7

Состав	Значение показателя
Ферментативный гидролизат казеина, г	5,0
Мясной экстракт, г	3,0
Галактоза, г	5,0
Глицерин, г	5,0
Азотнокислый калий (KNO_3), г	1,0
Динатрийфосфат (Na_2HPO_4), г	2,5
Агар, г	1,0—5,0*
Диазорезорин, г	0,001
Вода, $см^3$	1000
* В зависимости от гелеобразующей способности агара.	

5.5.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,3 ± 0,2) при 25 °С.

Среду разливают в пробирки с выросшей разводкой-культурой по 10 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С. Если среду не использовали в день приготовления, то ее хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более четырех недель после приготовления.

Непосредственно перед использованием подогревают в кипящей воде или на пару в течение 15 мин и затем быстро охлаждают до температуры разведения.

5.6 Нитратный реактив обнаружения (необязательно)

5.6.1 Раствор 5-амино-2-нафталинсульфокислоты (5-2-ANSA)

Растворяют 0,1 г 5-2-ANSA в 100 $см^3$ 15 %-ного (объемная доля) раствора уксусной кислоты. Фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив хранят в хорошо закупоренном флаконе (предпочтительно с капельницей шаровидной формы) в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

5.6.2 Раствор сульфаниловой кислоты

Растворяют 0,4 г сульфаниловой кислоты в 100 $см^3$ 15 %-ного (объемная доля) раствора уксусной кислоты. Фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив хранят в хорошо закупоренном флаконе (предпочтительно с капельницей шаровидной формы) в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

5.6.3 Приготовление полного реактива

Смешивают равные количества двух растворов (см. 5.6.1 и 5.6.2) непосредственно перед использованием. Неиспользованный реактив уничтожают.

5.7 Цинковая пыль (необязательно)

5.8 Лактозо-желатиновая среда

5.8.1 Состав *в соответствии с таблицей 8.*

Таблица 8

Состав	Значение показателя
Ферментативный гидролизат казеина, г	15,0
Дрожжевой экстракт, г	10,0
Галактоза, г	10,0
Желатин, г	120,0
Фенол красный, г	0,05
Вода, $см^3$	1000

5.8.2 Приготовление среды

Растворяют компоненты в воде (кроме лактозы и фенола красного). *Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,5 ± 0,2) при 25 °С.*

Добавляют лактозу и фенол красный. Среду разливают в пробирки по 10 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С. *Если среду не использовали в день приготовления, то ее хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более трех недель после приготовления.*

Непосредственно перед использованием подогревают в кипящей воде или на пару в течение 15 мин и затем быстро охлаждают до температуры разведения.

6 *Оборудование и лабораторная* посуда

Примечание — При одинаковой спецификации одноразовое оборудование предпочтительнее многоразового.

Используют обычное лабораторное оборудование, *а также* следующее:

6.1 Стерилизаторы сухожаровые (печи) или паровые (автоклавы) по *ГОСТ Р ИСО 7218.*

6.2 Термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С.

6.3 Анаэростат, обеспечивающий культивирование анаэробных микроорганизмов.

6.4 pH-метр с разрешением 0,01 единиц pH и точностью ± 0,1 pH при 25 °С.

6.5 Бактериологические петли из платино-иридиевого или никель-хромового сплава, около 3 мм в диаметре, и иглы из тех же материалов для пересева в агаровые косяки.

6.6 Приборы для фильтрования, предназначенные для стерилизации растворов.

6.7 Пробирки размером 16 × 160 мм с перевернутыми трубками Дархема, длиной 35 мм и диаметром 7 мм.

6.8 Пипетки с полным сливом, номинальным объемом от 1 до 10 $см^3$.

6.9 Чашки Петри, из стекла или пластмассы, диаметром 90—100 мм.

6.10 Водяная баня, поддерживающая температуру от 44 °С до 47 °С.

6.11 Резиновые колбы, используемые с градуированными пипетками для разбрызгивания компонентов нитратного реактива обнаружения (при необходимости).

7 Отбор проб

В лабораторию направляют представительный образец. Образец не должен быть поврежден или изменен в *процессе* транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, приведенного в настоящем стандарте. Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон касательно отбора проб конкретного продукта при отсутствии специального стандарта для данного продукта.

8 *Подготовка проб* для испытания

Подготовку проб проводят в соответствии со специальным стандартом для данного продукта. Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон касательно подготовки проб конкретного продукта при отсутствии специального стандарта на подготовку проб данного продукта.

9 *Проведение определения*

9.1 *Метод приготовления исходной суспензии и последующие разведения*

Приготовление пробы и первичного разведения в зависимости от вида продукта согласно соответствующей части ГОСТ 26669.

9.2 Посев и инкубирование (чашечный метод)

С помощью стерильной пипетки (см. 6.8) переносят в двух повторностях 1 *см*^{3} исходной суспензии или испытуемой пробы (если продукт жидкий) в центр пустых чашек Петри (см. 6.9).

Наливают в обе чашки от 10 до 15 *см*^{3} SC агара (см. 5.2.3), подогретого в водяной бане (см. 6.10) при температуре от 44 °С до 47 °С, и хорошо перемешивают с испытуемой пробой, осторожно вращая чашки. После затвердевания среды добавляют сверху 10 *см*^{3} *дополнительно* SC агара.

Оставляют чашки для затвердевания *агара. Застывшие чашки агара с исходной пробой* помещают в анаэростат или другие приборы, обеспечивающие культивирование анаэробных микроорганизмов, и инкубируют в анаэробных условиях в течение (20 ± 2) ч при температуре 37 °С.

Более продолжительное инкубирование может привести к излишнему почернению среды.

Повторяют процедуру с последующими десятикратными разведениями (см. 9.1).

9.3 Подсчет и выделение колоний

После установленного периода *инкубации* (см. 9.2) выделяют все чашки Петри, содержащие менее 150 колоний. Из них выделяют чашки с двумя последовательными разведениями. Подсчитывают на каждой чашке *характерные* колонии, предположительно относящиеся к C. perfringens.

Выделяют из каждой чашки пять типичных колоний и подтверждают их, используя одну из методик, описанных в 9.4.2 или 9.4.3.

9.4 Биохимическое подтверждение

9.4.1 Общие положения

Для целей подтверждения может быть использован набор сред для биохимических испытаний в соответствии с *ГОСТ Р ИСО 7218.*

9.4.2 Методика подтверждения с использованием среды LS

Примечание — Реакция, протекающая в лактозо-сульфитной среде (см. 5.4) при 46 °С, очень специфична для C. perfringens и C. absonum. Поэтому необязательно добиваться дополнительной очистки черных колоний, выделенных с агаровой среды, перед их посевом на тиогликолатную и затем на лактозо-сульфитную среду.

9.4.2.1 Пересев и инкубирование

Каждую изолированную колонию (см. 9.3) пересевают на жидкую тиогликолатную среду (см. 5.3). Инкубируют в анаэробных условиях в течение 18—24 ч при температуре 37 °С.

9.4.2.2 Обработка результатов

Исследуют пробирку с LS средой, учитывая образование газа и наличие черного окрашивания (осадок сульфита железа). Трубки Дархема, заполненные более чем на одну четвертую часть газом, и пробирки, содержащие черный осадок, оценивают как положительные.

В сомнительных случаях, когда трубка Дархема в пробирке с почерневшей средой заполнена газом менее чем на четверть, без промедления, с помощью стерильной пипетки переносят пять капель культуры с LS средой (см. 9.4.2.1) в другую пробирку с той же средой. Инкубируют на водяной бане (см. 6.10) при температуре от 46 °С в течение 18—24 ч. Оценивают эти пробирки, как описано выше.

Бактерии, которые образуют типичные колонии на LS среде и дают положительную реакцию подтверждения на LS среде, относят к C. perfringens. Во всех прочих случаях пробирки с посевами рассматривают как отрицательные.

9.4.3 Методика подтверждения с использованием подвижной нитратной среды и лактозо-желатиновой среды

9.4.3.1 Общие положения

Для данной методики подтверждения требуются хорошо изолированные типичные колонии. Если их нет (т. е. они чрезмерно разрослись на поверхности чашек, и нет возможности выбрать хорошо изолированные типичные колонии), засевают пять типичных колоний на предварительно деаэрированные жидкие тиогликолатные среды (см. 5.3).

Инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18—24 ч. Штрихуют колонии на чашках с основным агаром SC (5.2.1.2) и добавляют сверху 10 *см*^{3} основного агара SC.

Дают застыть агару и инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18—24 ч. Потом выбирают из каждой чашки одну типичную и хорошо выделенную колонию.

При необходимости повторяют штрихование и посев на чашки Петри с основным агаром SC до получения хорошо изолированных типичных колоний.

Подтверждают каждую колонию, как описано в 9.4.3.2, 9.4.3.3 и 9.4.3.4.

9.4.3.2 Инокуляция и исследование подвижной нитратной среды

Инокулируют уколом каждую выделенную колонию (см. 9.3) в только что деаэрированную подвижную нитратную среду (см. 5.5).

Инкубируют в анаэробных условиях при 3 °С в течение 24 ч. Исследуют пробирку с подвижной нитратной средой на тип культуры по линии укола. Подвижность очевидна по диффузному распределению бактерий в среду от линии укола.

Проводят испытание на присутствие нитрита, добавляя с помощью градуированной пипетки (см. 6.8) и резиновой колбы (см. 6.11) от 0,2 до 0,5 *см*^{3} нитритного реактива обнаружения (см. 5.6) в каждую пробирку с подвижной нитратной средой.

Примечание — В целях безопасности проводят это испытание в вытяжном шкафу.

Образование красного цвета подтверждает восстановление нитрата до нитрита. Если красный цвет не появляется в течение 15 мин, добавляют небольшое количество цинковой пыли (см. 5.7) и дают отстояться в течение 10 мин. Если красный цвет не появился после добавления цинковой пыли, восстановления нитрата не произошло.

9.4.3.3 Инокуляция и исследование лактозо-желатиновой среды

Инокулируют каждую выделенную колонию (см. 9.3) в только что деаэрированную лактозо-желатиновую среду (см. 5.8). Инкубируют в анаэробных условиях при 37 °С в течение 24 ч.

Исследуют пробирку с лактозо-желатиновой средой на присутствие газа и желтого цвета (благодаря образованию кислоты), указывающих на ферментацию лактозы. Охлаждают пробирки при 5 °С в течение 1 ч и проверяют на сжижение желатина. Если среда застыла, повторно инкубируют в течение еще 24 ч и снова проверяют на сжижение желатина.

9.4.3.4 Интерпретация

Бактерии, которые образуют черные колонии в среде SC, неподвижны, обычно восстанавливают нитрат до нитрита, вырабатывают кислоту и газ из лактозы и сжижают желатин за 48 ч, относятся к бактериям C. perfringens. Культуры, которые дают слабую реакцию на нитрит (т. е. розового цвета), должны быть ликвидированы, так как бактерии C. perfringens дают сильную и немедленную реакцию.

10 Обработка результатов

10.1 Метод расчета

Обработка результатов — *по ГОСТ Р ИСО 7218.*

10.2 Сходимость

10.2.1 Межлабораторные испытания

Данные о сходимости этого метода, описанные в настоящем стандарте, базируются на результатах межлабораторного испытания [1]. Детали этого межлабораторного испытания приведены в приложении А. Предельные значения повторяемости и воспроизводимости определялись на трех видах продуктов, загрязненных на разных уровнях, и на контрольных материалах.

Значения, полученные на основе этого межлабораторного испытания, не могут применяться к пределам концентраций и матрицам, отличным от приведенных здесь.

10.2.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя отдельными ($\log_{10}$-преобразованными) результатами испытаний (число C. perfringens на г или см^3) или отношение большего к меньшему из двух результатов по нормальной шкале, полученных при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование, в течение короткого допустимого промежутка времени, будет превышать предел повторяемости (r) не более чем в 5 % случаев.

В качестве общего показателя повторяемости (r) при испытании проб пищевых продуктов допускается использовать следующие значения. Эти значения r являются общими для всех матриц, рассматриваемых в процессе межлабораторного испытания:

- r = 0,21 для подтверждения LS или 0,25 для подтверждения MN/LG (выраженные как разница между $\log_{10}$-преобразованными результатами испытания) или
- r = 1,67 для подтверждения LS или 1,8 для подтверждения MN/LG (выраженные как отношение большего к меньшему из двух результатов испытания).

Для контрольных материалов (см. таблицу А.4) могут применяться следующие значения:

- r = 0,13 для подтверждения LS или 0,12 для подтверждения MN/LG (выраженные как разница между $\log_{10}$-преобразованными результатами испытания) или
- r = 1,3 для подтверждения LS или 1,8 для подтверждения MN/LG (выраженные как отношение большего к меньшему из двух результатов испытания).

Пример

Получен первый результат 10000 или $1,0 \times 10^4$ предполагаемых бактерий C. perfringens на грамм продукта. В условиях повторяемости отношение большего результата к меньшему не должно быть свыше 1,9. Следовательно, второй результат будет между 5263 (= 10000/1,9) и 19000 (10000 × 1,9) предполагаемых бактерий C. perfringens на грамм.

10.2.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными ($\log_{10}$-преобразованными) результатами испытаний (число C. perfringens на г или $см^3$) или абсолютное соотношение между результатами двух испытаний по нормальной шкале, полученными при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях, разными операторами, использующими различное оборудование, будут превышать предел воспроизводимости (R) не более чем в 5 % случаев.

В качестве показателя предела воспроизводимости (R) при испытании различных видов пищевых продуктов и контрольных материалов могут использоваться значения из таблицы 9. Эти значения r являются средними значениями, полученными в результате межлабораторного испытания для различных уровней[1)].

Таблица 9 — Примеры значений для R

Вид пробы	Подтверждение LS		Подтверждение MN и LG	
	R (log)*	R**	R (log)*	R**
Сыр	0,26	1,8	0,31	2,1
Мясо	0,55	3,5	0,52	3,3
Сухой корм для животных	0,65	4,5	0,72	5,3
Контрольный материал	0,27	1,9	0,29	1,9

* R (log) — предел воспроизводимости, выраженный как разность между $\log_{10}$-трансформированными результатами испытаний.

** R — предел воспроизводимости, выраженный как соотношение между результатами испытаний.

Примеры

1 Во-первых, лаборатория нашла результат испытания, равный 10000 или $1,0 \times 10^4$ C. perfringens на грамм сыра. В условиях воспроизводимости отношение большего результата к меньшему не должно быть свыше 2,1. Следовательно, результат второй лаборатории должен быть между 4761 (= 10000/2,1) и 21000 (10000 × 2,1) предполагаемых бактерий C. perfringens на грамм.

2 Во-вторых, лаборатория хочет знать максимальный уровень, который она может найти и который соответствует установленному уровню (например предел в 100000 или $\log_{10}5$). Для этого значение R (0,31 × 0,59) является разностью между $\log_{10}$-трансформированными результатами испытаний, а значение 1,52 ($10^{0,18}$) представляет соотношение между результатами испытаний. Следовательно, результаты до $\log_{10}5,18$ ($\log_{10}5 + \log_{10}0,18$) или 152000 (100000 × 1,52) не указывают несоответствие пределу. Коэффициент 0,59 отражает тот факт, что испытание с односторонним 95 %-ным интервалом проводят для того, чтобы узнать, превышен ли предел. Коэффициент 0,59 вычислен по формуле

$$0,59 = \frac{1,64}{1,96\sqrt{2}}.$$

[1)] В случае данного межлабораторного испытания значения воспроизводимости, которые должны быть выражены как общее значение, применимое ко всем пробам продуктов, очень сильно отличаются между пробами.

11 Протокол испытания

В протоколе испытания указывают:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- метод отбора пробы, если известен;
- использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- все детали исследования, не оговариваемые в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также детали иного свойства, могущие оказать влияние на результаты исследований;
- полученные результаты.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторного испытания

Межлабораторное совместное испытание [1], в котором принимали участие 17 лабораторий из 15 стран, проводилось на пробах сыра, мяса, сухого корма для животных и контрольном материале. Каждая проба пищевых продуктов/кормов для животных была испытана на трех различных уровнях загрязнения бактериями Clostridium perfringens.

В соответствии с [2] в процессе межлабораторного испытания были получены следующие параметры. Испытание было организовано Голландским национальным институтом общественного здоровья (RIVM) в январе 2000 г. и дало данные по сходимости, приведенные в таблицах А.1—А.4.

Таблица А.1 — Результаты анализа данных, полученных на пробах сыра

Проба	Сыр (низкий уровень)	Сыр (средний уровень)	Сыр (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0
Число принятых проб	26	26	26
Среднее значение $\bar{x}$ ($\log_{10}$cfu/g)	2,5/2,5[a]	3,5/3,5[a]	4,5/4,5[a]
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение повторяемости, %	0,11/0,11[a] 4,37/4,59[a]	0,06/0,07[a] 1,63/1,97[a]	0,08/0,10[a] 1,85/2,31[a]
Предел повторяемости r: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,30/0,32[a] 2,0/2,1[a]	0,16/0,19[a] 1,5/1,6[a]	0,23/0,29[a] 1,7/1,9[a]
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	0,13/0,13[a] 5,21/5,11[a]	0,08/0,15[a] 2,32/4,38[a]	0,11/0,14[a] 2,50/3,11[a]
Предел повторяемости R: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,36/0,35[a] 2,3/2,2[a]	0,23/0,43[a] 1,7/2,7[a]	0,31/0,39[a] 2,1/2,4[a]
[a] Первый результат был получен с использованием лактозо-желатиновой среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Таблица А.2 — Результаты анализа данных, полученных на пробах мясного фарша

Проба	Мясной фарш (низкий уровень)	Мясной фарш (средний уровень)	Мясной фарш (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0

Окончание таблицы А.2

Проба	Мясной фарш (низкий уровень)	Мясной фарш (средний уровень)	Мясной фарш (высокий уровень)
Число принятых проб	26	26	26
Среднее значение $\bar{x}$ ($\log_{10}$cfu/g)	2,7/2,7[a]	3,6/3,6[a]	4,5/4,5[a]
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение повторяемости, %	0,06/0,11[a] 2,32/4,22[a]	0,06/0,10[a] 1,67/2,70[a]	0,11/0,09[a] 2,33/2,01[a]
Предел повторяемости *r*: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,18/0,32[a] 1,5/2,1[a]	0,17/0,27[a] 1,5/1,9[a]	0,29/0,25[a] 2,0/1,8[a]
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	0,14/0,18[a] 5,01/6,54[a]	0,18/0,18[a] 5,07/5,05[a]	0,18/0,22[a] 3,90/4,76[a]
Предел повторяемости *R*: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,38/0,49[a] 2,4/3,1[a]	0,51/0,50[a] 3,2/3,2[a]	0,49/0,60[a] 3,1/4,0[a]
[a] Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Таблица А.3 — Результаты анализа данных, полученных на пробах сухого корма для животных

Проба	Сухой корм (низкий уровень)	Сухой корм (средний уровень)	Сухой корм (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0
Число принятых проб	25	25	25
Среднее значение $\bar{x}$ ($\log_{10}$cfu/g)	2,6/2,6[a]	3,8/3,9[a]	4,8/4,9[a]
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение повторяемости, %	0,07/0,10[a] 2,85/3,79[a]	0,08/0,08[a] 2,09/1,93[a]	0,06/0,04[a] 1,22/0,75[a]
Предел повторяемости *r*: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,21/0,28[a] 1,6/1,9[a]	0,22/0,21[a] 1,7/1,6[a]	0,16/0,10[a] 1,5/1,3[a]
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$cfu/g) Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	0,32/0,32[a] 12,21/12,03[a]	0,25/0,24[a] 6,53/6,18[a]	0,17/0,17[a] 3,50/3,49[a]
Предел повторяемости *R*: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,88/0,88[a] 7,6/7,6[a]	0,69/0,67[a] 4,9/4,7[a]	0,47/0,47[a] 3,03/3,0[a]
[a] Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Таблица А.4 — Результаты анализа данных, полученных на контрольном материале

Проба	Контрольный материал
Число лабораторий с положительными результатами	13
Число проб	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13
Число выбросов	0
Число принятых проб	26
Среднее значение $\overline{x}$ ($\log_{10}$cfu/g)	3,7/3,7[a]
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R ($\log_{10}$cfu/capsule) Среднее относительное отклонение повторяемости, %	0,05/0,5[a] 1,24/1,21[a]
Предел повторяемости r: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/ capsule) - как соотношение по нормальной шкале	 0,13/0,12[a] 1,3/1,3[a]
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$cfu/capsule) Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	0,09/0,09[a] 2,51/2,39[a]
Предел повторяемости R: - как разность по шкале $\log_{10}$ ($\log_{10}$cfu/capsule) - как соотношение по нормальной шкале	 0,26/0,25[a] 1,8/1,6[a]
[a] Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.	

Приложение В
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок

Таблица В.1

Обозначение ссылочного национального стандарта Российской Федерации	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта и условное обозначение степени его соответствия ссылочному национальному стандарту
ГОСТ Р ИСО 7218—2008	ИСО 7218—2007 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям» (IDT)
ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008	ИСО 11133-1—2000 «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» (IDT)
ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008	ИСО 11133-2—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 2. Практическое руководство по определению эффективности питательных сред» (IDT)
ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83)	ИСО 6887-1—1999 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений» (MOD); ИСО 6887-2—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для приготовления мяса и мясных продуктов» (MOD); ИСО 6887-3—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов» (MOD); ИСО 6887-4—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбопродуктов» (MOD)
ГОСТ Р 51448—90 (ИСО 3100-2—88)	ИСО 3100-2—88* «Мясо и мясные продукты. Отбор и подготовка опытных проб. Часть 2. Подготовка опытных проб для микробиологического исследования» (MOD)
Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов: - IDT — идентичные стандарты; - MOD — модифицированные стандарты.	

* Заменен на ИСО 6887-2:2003.

Библиография

[1] Schulten S.M., Benschop E., Nagelkerke N.J.D. и Mooijman K.A. Validation of microbiological methods: Enumeration of Clostridium perfringens according to ISO 7937 (второе издание, 1997). Отчет 286555002, Национальный институт общественного здоровья и окружающей среды, Bilthoven, Нидерланды, 2001

[2] ИСО 16140:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол проверки достоверности альтернативных методов

УДК 663/664.777:006.354 H00 ОКС 67.040, 65.120

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиология, горизонтальный метод обнаружения, презумптивные бактерии, наиболее вероятное число, бактерии Clostridium perfringens

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 02.11.2009. Подписано в печать 07.12.2009. Формат 60x84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,65. Тираж 298 экз. Зак. 842.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6

gost.e-ecolog.ru