ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54755— 2011

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

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 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии)

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 944-ст

4 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, 2012

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 Метод выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ 2
4.1 Метод выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa 2
4.2 Определение количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa 3
5 Метод определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованные селективно-диагностические среды — подсчет колоний 3
5.1 Метод посева на агаризованные селективно-диагностические среды 3
6 Питательные среды и реактивы 4
7 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы 6
8 Отбор и подготовка проб 7
9 Проведение испытания 7
10 Протокол испытания 10
11 Требования безопасности 10
Приложение А (справочное) Схемы методов выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ 11
Приложение Б (справочное) Расчет наиболее вероятного числа микроорганизмов 13

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa

Food products. Methods for detection and quantity determination of Pseudomonas aeruginosa bacteria

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa и методы определения их количества:

- метод наиболее вероятного числа (НВЧ);
- метод посева на агаризованные селективно-диагностические среды — подсчет колоний.

Метод определения НВЧ предусмотрен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не более 1500 или в 1 $см^3$ жидкого продукта не более 150 клеток бактерий вида Pseudomonas aeruginosa.

Метод определения количества посевом на агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 1500 или в 1 $см^3$ жидкого продукта не менее 150 КОЕ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa.

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 требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

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 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 54004—2010 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

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

ГОСТ 26670—91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

Издание официальное

ГОСТ 29228—91 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 30425—97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности

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.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бактерии вида Pseudomonas aeruginosa:** Аэробные грамотрицательные бактерии, которые образуют типичные колонии на агаризованных селективно-диагностических средах за счет образования пигментов (пиоцианина и флюоресцина), дают положительную реакцию на оксидазу, типичные по биохимическим признакам, если испытания проводятся в соответствии с методами, установленными в настоящем стандарте.

3.2 **выявление бактерий вида Pseudomonas aeruginosa:** Определение присутствия или отсутствия бактерий вида Pseudomonas aeruginosa в определенной массе или объеме продукта в соответствии с настоящим стандартом.

3.3 **определение количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa:**

3.3.1 Количество бактерий, содержащееся в 1 $см^3$ или 1 г продукта, определенное путем посева продукта и (или) его разведений на агаризованную селективно-диагностическую среду, подсчете после инкубирования при температуре 37 °С типичных колоний и подтверждении по отношению к окраске по Граму, присутствию оксидазы, образованию пигментов и по биохимическим признакам принадлежности бактерий из этих колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa. Подтверждение проводят по методам, приведенным в настоящем стандарте.

3.3.2 Количество бактерий, содержащееся в 1 $см^3$ или 1 г продукта, определенное по методу НВЧ, указанному в настоящем стандарте.

4 Метод выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ

Сущность методов

Метод выявления и определения НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa основан на высеве определенного количества продукта и (или) разведений пробы продукта в жидкую неселективную среду, инкубировании посевов, пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды для подтверждения по биохимическим и культуральным признакам роста принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa.

4.1 Метод выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa

4.1.1 Предварительное обогащение в неселективной среде

В триптон-соевый бульон, приготовленный по 6.1, или сердечно-мозговой бульон, приготовленный по 6.2, высевают анализируемую пробу, затем посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

4.1.2 Выделение типичных колоний

На поверхность агаризованной селективно-диагностической среды высевают культуру, полученную по 4.1.1, посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С.

Посевы просматривают через (24 ± 2) ч для определения присутствия колоний, типичных для бактерий вида Pseudomonas aeruginosa.

4.1.3 Подтверждение принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa

Типичные колонии, полученные по 4.1.2, пересевают на поверхность питательного агара для дальнейшего подтверждения принадлежности выделенных культур к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa.

4.1.4 Схема выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa приведена в приложении А.

4.2 Определение количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa

4.2.1 Предварительное обогащение в неселективной среде

В каждую из трех колб с 90 $см^3$ одной из неселективных сред по 4.1.1 вносят по 10 $см^3$ продукта, если продукт жидкий, или вносят по 10 $см^3$ исходного разведения продукта, приготовленного по ГОСТ 26669, в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

В каждую из трех пробирок с 9 $см^3$ одной из неселективных сред по 4.1.1 вносят по 1 $см^3$ продукта, если исходный продукт жидкий, или вносят по 1 $см^3$ исходного разведения (указанного выше) продукта в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

В каждую из трех пробирок с 9 $см^3$ одной из неселективных сред по 4.1.1 вносят по 1 $см^3$ первого десятикратного разведения продукта, если исходный продукт жидкий, или вносят по 1 $см^3$ первого десятикратного исходного разведения продукта в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Выбор объема пробы для анализа или ее разведения зависит от предполагаемой обсемененности продукта или от нормативных значений.

4.2.2 Выделение типичных колоний, подтверждение принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa

Выделение типичных колоний, подтверждение принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa проводят по 4.1.2 и 4.1.3.

4.2.3 Схема определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ приведена в приложении А.

4.2.4 Наиболее вероятное число бактерий вида Pseudomonas aeruginosa в 1 $см^3$ или 1 г пробы продукта (НВЧ) рассчитывают исходя из числа посевов, в которых подтверждено присутствие этих бактерий. Определение наиболее вероятного числа бактерий вида Pseudomonas aeruginosa проводят в соответствии с приложением Б (таблица Б.1).

5 Метод определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованные селективно-диагностические среды — подсчет колоний

Сущность метода

Метод определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованные селективно-диагностические среды основан на высеве определенного количества продукта и/или его разведений на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, инкубировании посевов, подсчете типичных колоний, подтверждении по биохимическим признакам принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa.

Разновидностью метода посева на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды является посев методом мембранной фильтрации.

5.1 Метод посева на агаризованные селективно-диагностические среды

5.1.1 На подсушенную поверхность агаризованной селективно-диагностической среды двух чашек Петри наносят 0,1—0,2 $см^3$ продукта, если продукт жидкий, или исходной суспензии в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

Две другие чашки Петри используют для исходной суспензии и/или десятикратных разведений продукта.

Внесенный в чашки Петри продукт или его исходные разведения распределяют по поверхности селективно-диагностической агаризованной питательной среды стерильным шпателем.

Посевы в чашках Петри инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

5.1.2 После инкубирования посевов отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 типичных колоний. Подсчитывают на отобранных чашках Петри количество выросших типичных колоний.

При посеве методом мембранной фильтрации на них подсчитывают колонии даже в том случае, если их менее 15.

Выбирают по пять типичных колоний каждого типа для пересева на поверхность питательного агара для дальнейшего подтверждения принадлежности выросших культур к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa. Если число выросших колоний менее 5, то отбирают все выросшие колонии.

5.1.3 Число колоний на 1 см^3 или на 1 г продукта рассчитывают по ГОСТ 26670, исходя из числа подтвержденных типичных колоний, выросших на чашках Петри.

6 Питательные среды и реактивы

Химические вещества, используемые для приготовления питательных сред и реактивов, должны быть аналитического качества, а вода дистиллированной.

6.1 Среда для неселективного обогащения: Триптон-соевый бульон

6.1.1 Состав

Гидролизат казеина, г	17,0
Папаиновый перевар соевой муки, г	3,0
Натрий хлористый, г	5,0
Калия гидрофосфат, г	2,5
Глюкоза, г	2,5
Вода, см^3	1000

6.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде. Нагревают среду на слабом огне до кипения, кипятят до полного растворения компонентов. Устанавливают pH так, чтобы он составлял (7,3 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С. Разливают среду по колбам или пробиркам и стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С.

6.2 Среда для неселективного обогащения: Сердечно-мозговой бульон

6.2.1 Состав

Настой мозга теленка, г	200,0
Настой мясной (из говядины), г	250,0
Протеозопептон, г	10,0
Натрий хлористый, г	5,0
Натрия гидрофосфат, г	2,5
Глюкоза, г	2,0
Вода, см^3	550

6.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде. Нагревают среду на слабом огне до полного растворения компонентов. Устанавливают pH так, чтобы он составлял (7,3 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С. Разливают среду по колбам или пробиркам и стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С.

6.3 Основа агара с цетримидом

6.3.1 Состав

Перевар панкреатический желатина, г	20,0
Магния хлорид, г	1,4
Калия сульфат, г	10,0
Цетримид*, г	0,3
Агар, г	15,0
Вода, см^3	1000

* Цетримид — четвертичное аммониевое соединение, обладающее антимикробной активностью.

6.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде, содержащей 10 см^3 глицерина. Нагревают среду на слабом огне до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры (45—55) °С. Устанавливают pH так, чтобы он составлял (7,2 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С, после чего среду стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С.

6.4 Агар для выделения псевдомонад

6.4.1 Состав

Перевар панкреатический желатина, г	20,0
Магния хлорид, г	1,4
Калия сульфат, г	10,0
Иргасан (триклозан)*, г	0,025
Агар, г	13,6
Вода, см^3	1000

* Триклозан — хлорсодержащее средство производное фенола.

6.4.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную основу среды в воде, содержащей 10 см^3 глицерина. Нагревают среду на слабом огне до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры (45—55) °С. Устанавливают pH так, чтобы он составлял (7,2 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С, после чего среду стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С.

6.5 Среда Гисса с мальтозой

Среду готовят по ГОСТ 10444.1 или по инструкции на этикетке.

6.6 ГРМ-агар (сухой питательный агар на основе гидролизата рыбной муки для культивирования микроорганизмов)

Среду готовят по инструкции на этикетке.

6.7 Мясо-пептонный агар

Среду готовят по ГОСТ 10444.1.

6.8 Нитратная среда

6.8.1 Состав

Бульон мясо-пептонный, дм^3	1
Калий азотнокислый, г	1,0

6.8.2 Приготовление

В 1 дм^3 мясо-пептонного бульона, приготовленного по ГОСТ 10444.1, растворяют при нагревании 1,0 г азотнокислого калия. При приготовлении агаризованной среды в нее дополнительно добавляют 12 г агара.

Среду разливают по 5—6 см^3 в пробирки и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Агаризованную среду после стерилизации оставляют в наклонном положении для получения скошенной поверхности.

6.9 Реактив для определения оксидазы

6.9.1 Состав

N,N,N',N'-тетраметил-*п*-фенилендиаминдигидрохлорид, г	1,0
Вода, см^3	100

6.9.2 Приготовление

Растворяют реактив в холодной воде температурой (10—15) °С.

Реактив готовят непосредственно перед использованием.

Допускается использовать имеющиеся в продаже диски или полоски. При этом следуют рекомендациям изготовителя.

6.10 Для увеличения количества высеваемой анализируемой пробы продукта допускается использование неселективных сред двойной концентрации. При приготовлении жидких сред двойной

концентрации количество ингредиентов или дегидратированной основы среды увеличивается в два раза, а количество воды остается без изменения.

6.11 Растворы и реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

6.12 Раствор сульфаниловой кислоты

6.12.1 Состав

Кислота сульфаниловая, г	0,8
Кислота уксусная 30 %-ная, $см^3$	до 100

6.12.2 Приготовление

0,8 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей 30 %, в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Объем доводят до метки тем же раствором уксусной кислоты. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят при температуре (4 ± 2) °С в тщательно закупоренных сосудах из темного стекла не более 2 мес.

6.13 Раствор 1-нафтола

6.13.1 Состав

1-нафтол, г	0,5
Кислота уксусная 30 %-ная, $см^3$	до 100

6.13.2 Приготовление

0,5 г 1-нафтола переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей 30 %, в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Объем доводят до метки тем же раствором уксусной кислоты.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.14 Раствор уксусной кислоты

6.14.1 Состав

Кислота уксусная ледяная, $см^3$	30
Вода, $см^3$	до 100

6.14.2 Приготовление

30 $см^3$ ледяной уксусной кислоты вносят в мерную посуду вместимостью 100 $см^3$. Объем доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.15 Допускается использование готовых и дегидратированных питательных сред, в т. ч. хромогенных, отечественного и импортного производства, зарегистрированных в установленном порядке.

Приготовление и применение питательных сред — в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 11133-1 и ГОСТ Р ИСО 11133-2.

7 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы

Приемлемой альтернативой посуды многоразового применения является одноразовая посуда, если она отвечает соответствующим требованиям.

7.1 Оборудование лабораторное для микробиологических исследований — по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ 10444.1.

7.2 Аппарат для сухой стерилизации (стерилизационный сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав) с регулирующими устройствами для поддержания заданной температуры с допустимой погрешностью не более ± 1 °С.

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

7.4 Баня водяная, поддерживающая заданную температуру от 44 °С до 47 °С с погрешностью ± 0,5 °С.

7.5 Прибор для мембранной фильтрации растворов.

7.6 Весы по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания: реактивов ± 0,1 мг, продукта ± 0,1 г.

7.7 Пробирки и колбы разной вместимости по ГОСТ 25336. Допускается использование флаконов или бутылок с нетоксичными металлическими или пластиковыми завинчивающимися крышками.

7.8 Микроскоп биологический, обеспечивающий просмотр в проходящем свете, с увеличением 900—1000×.

7.9 Петля платиново-иридиевая бактериологическая размером диаметра петли около 3 мм.

7.10 pH-метр с диапазоном измерений pH от 0 ед. pH до 14 ед. pH, погрешность измерений ± 0,01 ед. pH при температуре (20—25) °С.

7.11 Стекла предметные по ГОСТ 9284.

7.12 Стекла покровные по ГОСТ 6672.

7.13 Пипетки градуированные или автоматические, вместимостью от 1 до 10 $см^3$ по ГОСТ 29228.

7.14 Чашки Петри нормального размера (диаметр 100 мм) и/или большого размера (диаметр 150 мм) по ГОСТ 25336.

7.15 Штамм контрольный бактерий вида Pseudomonas aeruginosa.

7.16 Мальтоза.

7.17 Перевар желатина панкреатический.

7.18 Настой мясной.

7.19 Настой мозга теленка.

7.20 Протеозопептон.

7.21 Гидролизат казеина ферментативный.

7.22 Триклозан.

7.23 Цетримид.

7.24 Перевар соевой муки папаиновый.

7.25 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не хуже указанных выше.

8 Отбор и подготовка проб

Отбор и подготовка проб — по ГОСТ Р 54004, ГОСТ 26669.

Для испытания подготавливают представительную пробу, не поврежденную и не измененную при транспортировании и хранении.

9 Проведение испытания

9.1 Метод выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa

9.1.1 Проба для анализа и исходное разведение

Приготовление исходного разведения пробы для анализа — по ГОСТ 26669.

9.1.2 Предварительное обогащение в неселективной среде

В зависимости от требуемых пределов выявления *x* $см^3$ жидкой пробы или *x* $см^3$ исходной суспензии, если анализируемый продукт другой консистенции, переносят в колбу или пробирку, содержащие среду по 6.1 или 6.2. Количество высеваемого продукта и количество питательной среды должно быть в соотношении 1:10.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

При испытании высококислотных продуктов для предотвращения резкого снижения кислотности питательных сред (на 0,5 ед. pH и более) pH питательных сред после внесения в них продукта или его исходного разведения доводят до допустимых значений при помощи стерильного раствора гидроокиси натрия, приготовленного по ГОСТ 10444.1, или при приготовлении питательных сред pH устанавливают выше заданного с учетом его последующего снижения при внесении продукта. Объем добавляемого стерильного раствора гидроокиси натрия или величину, на которую необходимо увеличить pH при приготовлении питательных сред, устанавливают опытным путем.

Допускается доводить pH до нейтрального значения при помощи стерильного раствора гидроокиси натрия непосредственно в высококислотном продукте.

9.1.3 Выделение типичных колоний

Используя петлю, пересевают культуры из пробирок с неселективной питательной средой с признаками роста на поверхность одной из селективно-диагностических сред, приготовленных по 6.3 или 6.4.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

9.1.4 Выбор типичных колоний для подтверждения

После инкубирования посевов по 9.1.3 отмечают рост типичных колоний.

На агаре с цетримидом бактерии вида Pseudomonas aeruginosa образуют колонии голубого, сине-зеленого, желто-зеленого цвета или могут быть непигментированными.

На агаре с триклозаном бактерии вида Pseudomonas aeruginosa образуют колонии синие, сине-зеленые, желто-зеленые или зеленые.

Бактерии вида Pseudomonas aeruginosa на селективно-диагностических средах образуют колонии разного размера, часто с неровными краями.

Из каждой чашки, на которой обнаружены типичные колонии, выбирают по пять хорошо изолированных колоний каждого типа, отличающиеся по морфологии, и пересевают на поверхность питательного агара.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

9.1.5 Подтверждение принадлежности типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa

Принадлежность выросших культур к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa подтверждают по отношению к окраске по Граму, присутствию оксидазы и при необходимости определяют ферментацию мальтозы и редукцию нитратов.

9.1.5.1 Окраска по Граму

Приготовление мазков из культур, выросших на скошенной поверхности питательного агара по 9.1.4, и их окраску по Граму проводят по ГОСТ 30425.

Бактерии вида Pseudomonas aeruginosa — грамотрицательные палочки.

Допускается окраску по Граму заменять тестом Грегерсена. Для этого на предметном стекле в капле 3 %-ного водного раствора калия гидроокиси эмульгируют культуру микроорганизмов, взятую из колонии с плотной среды.

Если через несколько секунд взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, то это указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательным бактериям. У грамположительных бактерий слизистых нитей не образуется.

9.1.5.2 Определение присутствия оксидазы

Применяя платиново-иридиевую петлю или стеклянную палочку, отбирают культуры, выросшие на поверхности питательного агара по 9.1.4, и наносят штрихи на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для определения оксидазы.

Если при этом фильтровальная бумага не потемнеет в течение 10 с, то это означает, что бактерии вида Pseudomonas aeruginosa в анализируемой пробе не присутствуют и результат испытания считают отрицательным.

Для определения оксидазы допускается использовать диски и растворы отечественного и импортного (зарегистрированные в установленном порядке) промышленного производства. Для контроля качества дисков и растворов применяют музейные оксидазоположительные и оксидазоотрицательные культуры.

9.1.5.3 Определение ферментации мальтозы

Для определения ферментации мальтозы испытуемую культуру высевают уколом в среду Гисса с мальтозой.

Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Бактерии вида Pseudomonas aeruginosa мальтозу не ферментируют.

9.1.5.4 Определение редукции нитратов

При постановке реакции на подтверждение редукции нитратов предварительно убеждаются в том, что сама среда не содержит нитритов. Для этого в две контрольные пробирки со средой добавляют по 2 капли каждого из реактивов, приготовленных по 6.12 и 6.13. Если в течение 15 мин не происходит покраснения среды, то ее используют для определения нитратредуцирующей способности. При использовании агаризованной среды реактивы наносят на поверхность скошенного нитратного агара.

Для подтверждения редукции нитратов проводят посевы в пробирки с нитратной средой. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч, затем добавляют по две капли каждого из реактивов, приготовленных по 6.12 и 6.13.

Если в течение 15 мин не происходит покраснения среды, то добавляют в посев немного порошкообразного цинка и выдерживают еще 10 мин. Если после добавления цинка среда краснеет, то редукции нитратов вследствие отсутствия бактерий вида Pseudomonas aeruginosa не произошло и тест считают отрицательным. Если после добавления цинка среда не краснеет, то делают вывод о том, что редукция нитратов вследствие присутствия бактерий вида Pseudomonas aeruginosa произошла.

Бактерии вида Pseudomonas aeruginosa вызывают редукцию нитратов.

9.1.6 По результатам подтверждения к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa относят аэробные не образующие спор грамотрицательные оксидазоположительные палочки, образующие пигменты флюоресцин и пиоцианин, не ферментирующие мальтозу, вызывающие редукцию нитратов.

9.2 Определение количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ

Для посева используют не менее трех последовательных анализируемых проб продукта, отличающиеся между собой по массе или объему в 10 раз. Каждой анализируемой пробой продукта засевают три повторности. Выбираемая последовательность анализируемых проб зависит от предполагаемого уровня обсемененности продукта или от нормативного значения.

9.2.1 Проба для анализа, исходное разведение и десятикратные разведения

Готовят необходимое число разведений так, чтобы все пробирки, соответствующие конечному разведению, показывали отрицательный результат.

9.2.2 Инокуляция

Используют три пробирки для каждой пробы продукта для анализа и (или) его разведения.

9.2.3 Предварительное обогащение в неселективной среде

В каждую из трех колб с 90 $см^3$ одной из сред, приготовленных по 6.1 или 6.2, вносят по 10 $см^3$ продукта, если исходный продукт жидкий, или вносят по 10 $см^3$ исходного разведения продукта в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

В каждую из трех пробирок с 9 $см^3$ одной из сред, указанных выше, вносят по 1 $см^3$ продукта, если исходный продукт жидкий, или вносят по 1 $см^3$ исходного разведения продукта в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

В каждую из трех пробирок с 9 $см^3$ одной из сред, указанных выше, вносят по 1 $см^3$ первого десятикратного разведения продукта, если исходный продукт жидкий, или вносят по 1 $см^3$ первого десятикратного исходного разведения продукта в случае, если анализируемый продукт другой консистенции.

Каждое последующее разведение высевают, используя новую стерильную пипетку. Осторожно перемешивают инокулум и среду.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

9.2.4 Выделение типичных колоний, подтверждение принадлежности выделенных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa

Выделение типичных колоний, подтверждение принадлежности выделенных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa проводят по 9.1.5 и 9.1.6.

9.2.5 Наиболее вероятное число (НВЧ) бактерий вида Pseudomonas aeruginosa в 1 $см^3$ или 1 г пробы продукта рассчитывают исходя из числа посевов, в которых подтверждено присутствие этих бактерий. Определение наиболее вероятного числа проводят в соответствии с приложением Б (таблица БД.1).

9.3 Метод определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованные селективно-диагностические среды — подсчет колоний

9.3.1 Проба продукта для анализа и исходное разведение

Приготовление исходного разведения и десятикратных разведений — по ГОСТ 26669.

9.3.2 Метод определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованные селективно-диагностические среды — подсчет колоний

По 0,1 или 0,2 $см^3$ анализируемой пробы продукта или ее разведения наносят на поверхность одной из сред, приготовленных по 6.3 или 6.4, двух чашек Петри. Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посев проводят по ГОСТ 26670.

При посеве методом мембранной фильтрации фильтры переносят на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, избегая образования пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.

Засеянные чашки переворачивают крышкой вниз и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

9.3.3 Подсчет количества колоний

После инкубации по 9.3.2. отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Посевы просматривают и отмечают рост типичных колоний.

При посеве методом мембранных фильтров на них подсчитывают количество колоний и в том случае, если их не более 15.

Характеристика типичных колоний — по 9.1.5.

9.3.4 Подтверждение принадлежности бактерий из колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa

Отбирают не менее пяти типичных колоний. Каждую отобранную колонию пересевают на поверхность питательного агара. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Подтверждение принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa проводят по 9.1.5 и 9.1.6.

9.3.5 Допускается также выявление бактерий вида Pseudomonas aeruginosa проводить посевом на агаризованную среду при условии, что анализируемую пробу продукта, в которой предусматривается выявление, возможно посеять по этому методу.

При выявлении бактерий вида Pseudomonas aeruginosa посевом на агаризованную среду подсчет количества колоний не проводят.

9.3.6 Подсчет и выражение результатов

Если при подтверждении типичных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост бактерий вида Pseudomonas aeruginosa, то считают, что все колонии, выросшие на чашке Петри (9.3.3), принадлежат к бактериям вида Pseudomonas aeruginosa. В остальных случаях количество бактерий вида Pseudomonas aeruginosa определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

Пересчет количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa, определенного посевом на агаризованные среды, на 1 г (см^3) продукта проводят по ГОСТ 26670.

Результаты определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa и выявления их в определенной пробе продукта оформляют по ГОСТ 26670.

10 Протокол испытания

Результаты оценивают по каждой анализируемой пробе отдельно.

Протокол испытания должен включать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации продукта;
- применяемый метод в соответствии с настоящим стандартом;
- все детали испытания, не установленные настоящим стандартом;
- полученный(е) результат(ы).

11 Требования безопасности

Требования к безопасности при выполнении работ и квалификации оператора — по ГОСТ Р ИСО 7218.

Приложение А
(справочное)

Схемы методов выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ

А.1 Схема определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa по методу НВЧ с предварительным обогащением приведена на рисунке А.1.

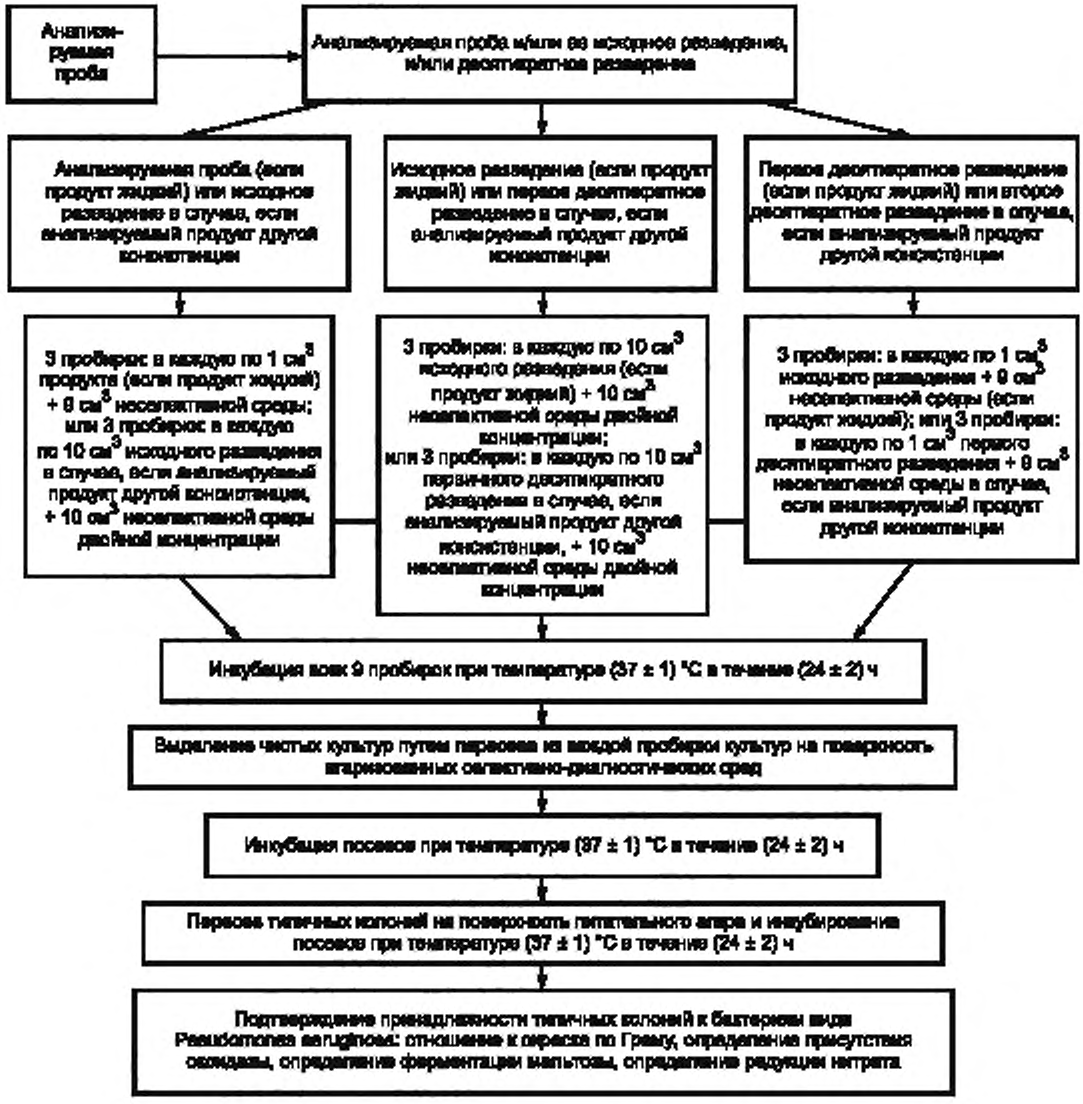


Рисунок А.1

А.1.2 Подсчет НВЧ проводят в соответствии с таблицей Б.1 настоящего стандарта.

А.2 Схема выявления бактерий вида Pseudomonas aeruginosa с предварительным обогащением приведена на рисунке А.2.

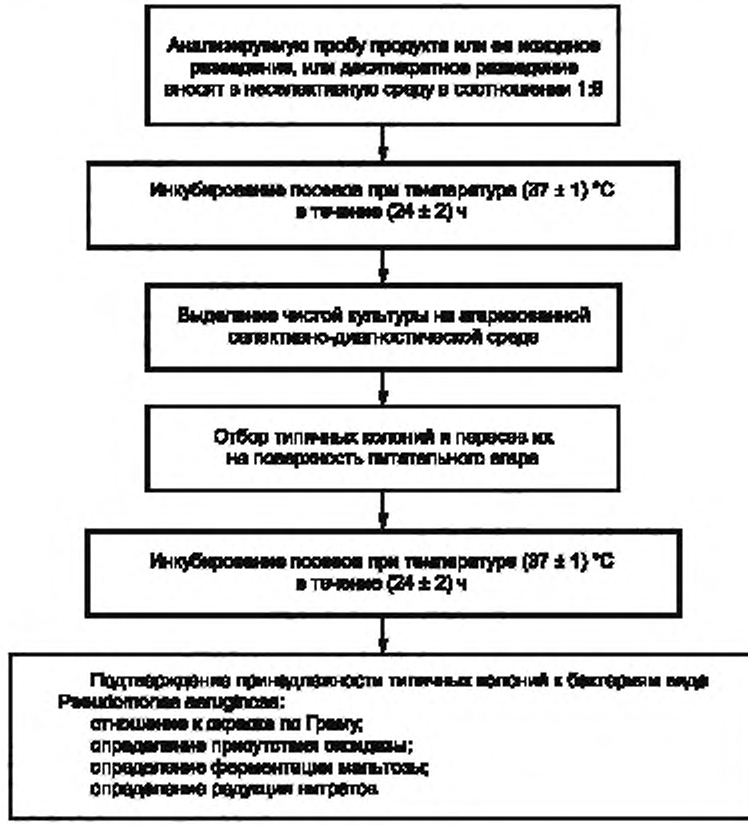


Рисунок А.2

Приложение Б
(справочное)

Расчет наиболее вероятного числа микроорганизмов

Б.1 Расчет наиболее вероятного числа микроорганизмов приведен в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Количество положительных пробирок в каждом из трех последовательных разведений			НВЧ	Категория оценки НВЧ для разного количества одновременно анализируемых проб					Фактическое количество микроорганизмов в 1 г ($см^3$) с вероятностью	
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		1	2	3	5	10	95 %	99 %
0	0	0	< 3	—	—	—	—	—	0,0—9,4	0,0—14,0
0	1	3	3	3	2	2	2	1	0,1—9,5	0,0—14,0
0	0	3	2	2	1	1	1	1	0,1—10,0	0,0—16,0
0	1	1	6	0	3	3	3	3	1,2—17,0	0,5—25,0
0	2	0	6	3	2	2	2	1	1,2—17,0	0,5—25,0
0	3	0	9	0	0	0	0	3	3,5—35,0	1,8—46,0
1	0	0	4	1	1	1	1	1	0,2—17,0	0,1—25,0
1	0	1	7	2	1	1	1	1	1,2—17,0	0,5—25,0
1	0	2	11	0	0	0	3	3	4,0—35,0	2,0—46,0
1	1	0	7	1	1	1	1	1	1,3—20,0	0,6—27,0
1	1	1	11	3	3	3	2	2	4,0—35,0	2,0—46,0
1	2	0	11	2	2	1	1	1	4,0—35,0	2,0—46,0
1	2	1	15	3	3	3	3	2	5,0—38,0	2,0—52,0
1	3	1	16	3	3	3	3	2	5,0—38,0	2,0—52,0
2	0	0	9	1	1	1	1	1	1,5—35,0	0,7—46,0
2	0	1	14	2	1	1	1	1	4,0—35,0	2,0—46,0
2	0	2	20	0	3	3	3	3	5,0—38,0	2,0—52,0
2	1	0	15	1	1	1	1	1	4,0—38,0	2,0—52,0
2	1	1	20	2	2	1	1	1	5,0—38,0	2,0—52,0
2	1	2	27	0	3	3	3	3	9,0—94,0	5,0—142,0
2	2	0	21	1	1	1	1	1	5,0—40,0	2,0—55,0
2	2	1	28	3	2	2	2	1	9,0—94,0	5,0—142,0
2	2	2	35	0	0	0	0	3	9,0—94,0	5,0—142,0
2	3	0	29	3	2	2	2	1	9,0—94,0	5,0—142,0
2	3	1	36	0	3	3	3	3	9,0—94,0	5,0—142,0
3	0	0	23	1	1	1	1	1	5,0—94,0	3,0—142,0
3	0	1	38	1	1	1	1	1	9,0—104,0	5,0—157,0
3	0	2	64	3	3	2	2	2	16,0—181,0	10,0—250,0
3	1	0	43	1	1	1	1	1	9,0—181,0	5,0—250,0
3	1	1	75	1	1	1	1	1	17,0—199,0	11,0—270,0
3	1	2	120	3	2	2	2	1	30,0—360,0	20,0—440,0

Окончание таблицы Б.1

Количество положительных пробирок в каждом из трех последовательных разведений			НВЧ	Категория оценки НВЧ для разного количества одновременно анализируемых проб					Фактическое количество микроорганизмов в 1 г ($см^3$) с вероятностью	
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		1	2	3	5	10	95 %	99 %
3	1	3	160	0	0	0	3	3	30,0—380,0	20,0—520,0
3	2	0	93	1	1	1	1	1	18,0—360,0	12,0—430,0
3	2	1	150	1	1	1	1	1	30,0—380,0	20,0—520,0
3	2	2	210	2	1	1	1	1	30,0—400,0	20,0—560,0
3	2	3	290	3	3	3	2	2	90,0—990,0	50,0—1520,0
3	3	0	240	1	1	1	1	1	40,0—990,0	30,0—1520,0
3	3	1	460	1	1	1	1	1	90,0—1960,0	50,0—2830,0
3	3	2	1100	1	1	1	1	1	200,0—4000,0	100,0—5700,0
3	3	3	> 1100	—	—	—	—	—	—	—

Описание метода НВЧ и разъяснение по его применению

1 Из пробы продукта для анализа готовят исходное разведение и ряд десятикратных разведений до такой степени, чтобы можно было определить предполагаемое НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa.

Высеваемые объемы продукта и его разведения выбирают следующим образом:

а) по 1 $см^3$ из разведения 10^{-1} и последующих разведений, если необходимо определить количество бактерий вида Pseudomonas aeruginosa, превышающее 3 клетки в 1 г ($см^3$) продукта;

б) по 10 $см^3$ из разведения 10^{-1} или 1 $см^3$ неразведенного продукта и по 1 $см^3$ из разведения 10^{-1} и последующих разведений, если необходимо определить количество бактерий вида Pseudomonas aeruginosa, превышающее 3 клетки в 10 г ($см^3$) продукта;

в) по 10 и 1 $см^3$ неразведенного продукта и ряда его разведений, если необходимо определить количество бактерий вида Pseudomonas aeruginosa, превышающее 3 клетки в 100 г ($см^3$) продукта.

2 Разведения и неразведенный продукт высевают параллельно в три колбы (пробирки) с питательной средой. Инокулум объемом 1 $см^3$ высевают в 10 $см^3$ среды нормальной концентрации, инокулумы объемом 10 $см^3$ высевают в 10 $см^3$ среды двойной концентрации или в 90 $см^3$ среды нормальной концентрации.

3 Посевы инкубируют в условиях, указанных в настоящем стандарте.

4 НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa определяют исходя из количества положительных пробирок с посевами по таблице.

5 Для определения НВЧ выбирают три последовательных разведения, в первом из которых все три повторности положительные, а в последнем и в последующем уже неоцениваемом разведении — все три повторности отрицательные (например: 3, 2, 0 или 3, 2, 1,0).

6 Если после разведения, в котором все три пробирки были отрицательными, одна из пробирок большего (то есть следующего за ним) разведения окажется положительной (например: 3, 2, 0, 1), то для определения НВЧ учитывают три разведения, начиная с того, в котором количество положительных пробирок было меньше трех (то есть 2, 0,1).

7 Если после наибольшего разведения с тремя положительными пробирками было посеяно лишь одно разведение, в котором оказались положительными одна или две пробирки, то НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa записывают как «более чем», так как в последующих разведениях могли бы быть положительные пробирки. Например, при посеве число положительных пробирок соответствовало 3, 3, 1 или 3, 3, 2, то согласно таблице НВЧ будет более чем 460 или более чем 1100.

8 Если ни в одном из разведений не было трех положительных пробирок, то для определения НВЧ учитывают три последовательных разведения (например: 2, 2, 1, 0 или 2, 1, 0, 0).

9 Если все пробирки посеянных разведений будут отрицательными (то есть 0, 0, 0), то НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa ниже числа, выявляемого посеянными разведениями (например, «ниже чем 3 в 10 г»), и наоборот, если все пробирки посеянных разведений будут положительными (то есть 3, 3,3), то НВЧ будет выше его максимального значения, определяемого посеянными разведениями (например, «выше чем 1100 в 1 г»).

При необходимости определения конечного числа бактерий исследование повторяют.

10 Если три десятикратных разведения были более низкими или более высокими по сравнению с приведенными в таблице, то НВЧ бактерий вида Pseudomonas aeruginosa в продукте будет на столько разрядов ниже или выше, на сколько разрядов посеянные разведения отличаются от табличных.

Например, для комбинации чисел 3, 2, 1 НВЧ составляет 150 микроорганизмов в 1 г продукта в случае, если посеяны по 1 $см^3$ разведения 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}. Если для посева использованы разведения 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, то найденное НВЧ равно 150 · 10 = 1500 микроорганизмов в 1 г ($см^3$). Если для посева использовались 10 и 1 $см^3$ неразведенного продукта и 1 $см^3$ разведения 10^{-1}, то НВЧ равно 150:100 = 1,5 в 1 г ($см^3$) или 15 микроорганизмов в 10 $см^3$ продукта.

11 Из значений НВЧ учитывают те, которые отвечают наиболее вероятным комбинациям трехзначного числа первой категории. Если НВЧ, соответствующего комбинации трехзначного числа первой категории, не получено, то его определяют комбинациями трехзначного числа, соответствующего второй категории.

Приведенные в таблице наиболее вероятные числа соответствуют случаям, когда высевали по 1 $см^3$ из 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} разведений, то есть 0,1; 0,01 и 0,001 г ($см^3$) продукта.

Категория 1 — наиболее часто встречаемые комбинации положительных пробирок, вероятность получения которых равна 95 %.

Категория 2 — комбинации положительных пробирок, вероятность получения которых равна 4 %.

Категория 3 или 0 — комбинации положительных пробирок, вероятность получения которых для нормальных продуктов равна нулю для категории 0 либо мало вероятна для категории 3. Комбинации этих категорий могут быть следствием ошибки опыта или присутствия в продукте бактериостатических веществ.

С увеличением числа испытуемых проб от одной и той же партии продукта точность НВЧ повышается на одну, а иногда и на две категории.

Разъяснение к методу определения НВЧ в не жидких продуктах

При определении НВЧ в нежидких продуктах исходное разведение не всегда может быть десятикратным. При испытании нежидких продуктов следует иметь в виду, растворяются эти продукты или нет (в этом случае получается смыв с продукта). Если исходное разведение не десятикратное, то оно берется за основу и из него готовят десятикратные разведения.

НВЧ определяют сначала в 1 $см^3$ исходного разведения, а затем это значение пересчитывается на 1 г продукта.

Пример 1. Испытание растворимых продуктов (сахар, соль, пасты и т. д.).

Для приготовления исходного разведения 20 г продукта внесли в 50 $см^3$ раствора для приготовления разведений.

20 г + 50 $см^3$ = 70 $см^3$ раствора, который берется за основу для приготовления десятикратных разведений.

Для подсчета по методу НВЧ выбираем 3 последовательных разведения, например:

10 $см^3$ исходного разведения;

1 $см^3$ исходного разведения;

1 $см^3$ первого десятикратного исходного разведения.

Выбранные разведения посеяли в 3-кратной повторности.

Предположим, получены в конце испытания следующие результаты:

10 $см^3$ исходного разведения	+ + +	т. е. 3;
1 $см^3$ исходного разведения	+ – –	т. е. 1;
1 $см^3$ первого десятикратного исходного разведения	– – –	т. е. 0.

По таблице НВЧ для числа 310 находим количество, равное 43, это число необходимо разделить на 100, т. к. выбранные для посева разведения отличаются от табличных в 100 раз. Табличные: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, а посеянные 10^{1}, 10^{0}, 10^{-1}.

43:100 = 0,43 клетки — это количество в 1 $см^3$ исходного раствора, принятого за основу.

Пересчитаем это количество на 1 г испытуемого продукта:

0,43 × 70:20 = 0,805 клетки в 1 г продукта или приблизительно 8 клеток в 10 г продукта.

Пример 2. Испытание нерастворимых продуктов (морковь, специи и т. д.).

При испытании нерастворимых продуктов получается смыв микроорганизмов с продукта. Расчет НВЧ — аналогичный указанному в п. 1, за исключением того, что в расчет берут не 70 (20 г + 50 $см^3$), а 50 $см^3$.

0,43 × 50:20 = 1,07 клетки в 1 г или 11 клеток в 10 г.

УДК 663/.664:543.9:006.354 ОКС 07.100.30 Н09 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: метод выявления бактерии вида Pseudomonas aeruginosa, метод наиболее вероятного числа (НВЧ), метод посева на агаризованные селективно-диагностические среды, питательные среды и реактивы, отбор и подготовка проб, проведение испытания, протокол испытания

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 30.08.2012. Подписано в печать 20.09.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,80. Тираж 221 экз. Зак. 779.

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