МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 10444.8— 2013

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий Bacillus cereus

Метод подсчета колоний при температуре 30 °С

(ISO 7932:2004, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии) на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 44–2013 от 14 ноября 2013 г.)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30° C (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий Bacillus cereus. Метод подсчета колоний при температуре 30 °С) путем внесения дополнительных положений, а также путем исключения пункта 10.3, приложений А и В международного стандарта, требования которых нецелесообразно применять, что обусловлено потребностями национальных экономик государств, указанных выше.

Содержание исключенных пункта 10.3, приложений А и В приведено в приложении А.

Дополнительные положения приведены в разделе 2, пунктах 5.4 – 5.10, подпунктах 9.4.4, 9.4.5 и 9.4.6, разделе 12 и заключены в рамки из тонких линий.

Международный стандарт разработан подкомитетом ISO/TC 34/SC 9 «Микробиология» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и межгосударственных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Степень соответствия – модифицированная (MOD).

Ссылки на международные стандарты, которые приняты в качестве межгосударственных стандартов, заменены в разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылками на соответствующие идентичные межгосударственные стандарты.

Информация о замене ссылок приведена в приложении Б.

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта приведено в дополнительном приложении ДВ

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 2130-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 10444.8–2013 (ISO 7932:2004) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

6 ВЗАМЕН ГОСТ 10444.8–88

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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, 2014

В Российской Федерации 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

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

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий Bacillus cereus

Метод подсчета колоний при температуре 30 °С

Microbiology of food and animal feeding stuffs.
Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*
Colony-count technique at 30 °C

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и корма для животных и устанавливает горизонтальный метод подсчета жизнеспособных презумптивных *Bacillus cereus*, путем подсчета выросших на плотной питательной среде колоний при температуре 30 °С. Метод применим также для испытания проб окружающей среды, отобранных из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

Термин «презумптивный» указывает на то, что данный метод не предусматривает дифференциацию *B. cereus* от других тесно связанных с ними, но менее часто встречаемых видов *Bacillus*, таких как *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ISO 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*

ISO 6887-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для подготовки мяса и мясных продуктов

ISO 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

ISO 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, рыбы и рыбных продуктов

ISO 6887-5:2010 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб для анализа, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологического исследования. Часть 5. Специальные правила подготовки молока и молочных продуктов

ГОСТ 6709−72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям**

ГОСТ ISO 11133-2–2011 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

* Действует до введения ГОСТ, разработанного на основе ИСО 6887-1:1999. Перевод стандарта имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации

** В международном стандарте дана ссылка на ИСО 7218:1996/Amd.1:2001, который заменен на ISO 7218:2007.

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

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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. 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 применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **презумптивный Bacillus cereus (presumptive Bacillus cereus):** Микроорганизм, который образует типичные колонии на поверхности селективной питательной среды, и который дает характерную реакцию при подтверждении в условиях, устанавливаемых в настоящем стандарте.

4 Сущность метода

4.1 Определенное количество пробы для испытания, если исходный продукт жидкий, или определенное количество исходной суспензии в случае использования продуктов других консистенций, высевают на поверхность плотной селективной питательной среды, находящейся в чашках Петри.

Для посева десятичных разведений используют дополнительные чашки Петри, приготовленные также как для посева пробы для испытания или исходной суспензии.

4.2 Чашки инкубируют в аэробных условиях при температуре 30 °С в течение 18–48 ч.

4.3 Количество *B. cereus* на грамм или кубический сантиметр пробы рассчитывают в зависимости от количества подтвержденных колоний, выросших на чашках Петри и уровня разведений, выбранных для посева таких, чтобы получить достоверный результат.

5 Растворы для разведений, питательные среды и реактивы

5.1 Растворы для разведений

Используют растворы для разведений по ISO 6887-1 и ГОСТ 26669 или любому другому стандарту, касающегося исследуемого продукта.

5.2 Плотная среда MYP-агар

5.2.1 Основа среды

5.2.1.1 Состав

Мясной экстракт ..... 1,0 г
Ферментативный перевар казеина ..... 10,0 г
D-Маннитол ..... 10,0 г
Хлорид натрия (NaCl) ..... 10,0 г
Феноловый красный ..... 0,025 г
Агар ..... от 12 до 18 г [а)]
Вода[б)] ..... 900 см^3

[а)] В зависимости от желирующих свойств.

[б)] Для приготовления питательных сред и реактивов используют дистиллированную воду по ГОСТ 6709.

5.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают.

Если необходимо, устанавливают уровень pH приготовленной среды (5.2.4) так, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,2 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С.

Разливают среду по 90 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости.

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

5.2.2 Раствор полимиксина В

5.2.2.1 Состав

Сульфат полимиксина В	10^6 МЕ
Вода	100 $см^3$

5.2.2.2 Приготовление

Растворяют сульфат полимиксина В в воде. Стерилизуют путем фильтрации.

5.2.3 Яично-желточная эмульсия

Используют свежие куриные яйца с неповрежденной скорлупой. Моют яйца жидким моющим средством, используя щетку. Промывают под проточной водой, погружают в 95 %-ный (по объему) этиловый спирт на 30 с и высушивают. Соблюдая правила асептики, разбивают каждое яйцо и отделяют желток от белка, переливая его несколько раз из одной половинки скорлупы в другую. Помещают желтки в стерильный измерительный цилиндр и добавляют четыре части стерильной воды (по объему). Переносят, соблюдая правила асептики, в стерильные колбы и энергично перемешивают.

Нагревают смесь на водяной бане (6.4) в течение 2 ч при температуре от 44 °С до 47 °С. Затем оставляют смесь для образования осадка на 18–24 ч при температуре (5 ± 3) °С. Собирают надосадочную эмульсию, соблюдая правила асептики.

Срок хранения эмульсии при температуре (5 ± 3) °С – не более 72 ч.

5.2.4 Готовая среда (MYP агар)

5.2.4.1 Состав

Основа среды (5.2.1)	90 $см^3$
Раствор полимиксина В (5.2.2)	1,0 $см^3$
Яично-желточная эмульсия (5.2.3)	10,0 $см^3$

5.2.4.2 Приготовление

Расплавляют основу среды и охлаждают на водяной бане (6.4) при температуре от 44 °С до 47 °С. Добавляют другие жидкости, хорошо перемешивая после каждого добавления. Охлаждают готовую среду на водяной бане (6.4) при температуре от 44 °С до 47 °С.

5.2.5 Приготовление чашек с агаром

Разливают по 15–20 $см^3$ готовой среды (5.2.4) в стерильные чашки Петри (6.6) и оставляют для застывания на горизонтальной поверхности.

Перед подсушкой поверхности питательной среды чашки хранят при температуре 5 °С ± 3 °С до четырех дней.

Непосредственно перед использованием среду подсушивают, предпочтительно со снятыми крышками, перевернув их агаровой поверхностью вниз. Подсушивают в сушильном шкафу или инкубаторе (6.2) при температуре от 37 °С до 55 °С до тех пор, пока поверхность агара не станет сухой.

5.2.6 Проверка рабочих характеристик

Проверку рабочих характеристик проводят по ГОСТ ISO 11133-2 (приложение В).

5.3 Агар с бараньей кровью

5.3.1 Кровяная агаровая основа среды

5.3.1.1 Состав

Протеозопептон или эквивалентный пептон	15 г
Печеночный гидролизат	2,5 г
Дрожжевой экстракт	5 г
Хлорид натрия (NaCl)	5 г
Агар	от 12 до 18 г[a)]
Вода	1000 $см^3$

[a)] *В зависимости от желирующих свойств.*

5.3.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную питательную среду в воде при кипячении. Если необходимо, устанавливают уровень pH среды так, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,2 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С.

Разливают среду в колбы и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

5.3.2 Дефибринированная баранья кровь

5.3.2.1 Готовая среда

Состав

Основа среды (5.3.1)……100 см^3

Дефибринированная баранья кровь……от 5 до 7 см^3

Приготовление

К основе среды (5.3.1) после охлаждения до температуры 44 °С – 47 °С добавляют дефибринированную баранью кровь. Перемешивают.

Разливают порциями по 12 см^3 готовой среды в стерильные чашки Петри (6.6) и оставляют на горизонтальной поверхности до застывания.

5.4 Нитратная среда

5.4.1 Состав

Бульон мясо-пептонный, дм^3……1

Калий азотнокислый, г……1,0

5.4.2 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.

5.5 Раствор сульфаниловой кислоты

5.5.1 Состав

Кислота сульфаниловая, г……0,8

Кислота уксусная 30 %-ная, см^3……до 100

5.5.2 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 хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 2 мес.

5.6 Раствор 1-нафтола

5.6.1 Состав

1-нафтол, г……0,5

Кислота уксусная 30 %-ная, см^3……до 100

5.6.2 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.

5.7 Раствор уксусной кислоты 15 %-ный и 30 %-ный

5.7.1 Состав

Кислота уксусная ледяная, см^3……15 или 30

Вода, см^3……до 100

5.7.2 Приготовление

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

5.8 Раствор 5-амино-2-нафтален сульфоновой кислоты

5.8.1 Состав

5-амино-2-нафтален сульфоновой кислоты.....0,1 г
15 %-ная (по объему) уксусная кислота.....100 $см^3$

5.8.2 Приготовление

0,1 г 5-амино-2-нафтален сульфоновой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей 15 %, 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 хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 3 мес.

5.9 Раствор сульфаниловой кислоты

5.9.1 Состав

Кислота сульфаниловая, г 0,4
Кислота уксусная 15 %-ная, $см^3$.....до 100

5.9.2 Приготовление

0,4 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей 15 %, 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 хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 2 мес.

Примечание – Среду 5.4 и растворы с 5.5 по 5.9 применяют для постановки теста по определению редукции нитратов.

5.10 Допускается использование готовых и дегидратированных питательных сред, в т. ч. хромогенных, и их компонентов по качеству не уступающих вышеуказанным.

6 Оборудование и лабораторная посуда

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

Применяют микробиологическое лабораторное оборудование по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ 10444.1.

6.1 Оборудование для сухой стерилизации (сушильный шкаф) или стерилизации паром (автоклавы) по ГОСТ ISO 7218.

6.2 Сушильный шкаф или инкубатор с конвекционной вентиляцией для сушки агаровых пластин, поддерживающий температуру от (37 ± 1) °С до (55 ± 1) °С.

6.3 Инкубаторы (термостаты), поддерживающие температуру (30 ± 1) °С.

6.4 Водяные бани, поддерживающие температуру от 44 °С до 47 °С.

6.5 pH-метр, с точностью ± 0,1 ед. pH при температуре 25 °С.

6.6 Чашки Петри, стеклянные или пластмассовые диаметром от 90 до 100 мм или, если необходимо, 140 мм по ГОСТ 25336.

6.7 Пипетки градуированные, калиброванные только для бактериологического применения, номинальной вместимостью 10,2 и 1 $см^3$, с ценой деления 0,5 и 0,1 $см^3$, и с выходным отверстием с номинальным диаметром от 2 до 3 мм по ГОСТ 29228.

6.8 Шпатели из стеклянного или пластмассового стержня диаметром приблизительно 3,5 мм и длиной 20 см, изогнутые под прямым углом на расстоянии около 3 см от одного конца; обрезанные концы должны быть ровными (оплавленными).

7 Отбор проб

Отбор проб по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Важно, чтобы в лабораторию поступала представительная проба, которая не была повреждена или изменена при транспортировке или хранении.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. В случае отсутствия конкретного стандарта на отбор проб продукта рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по процедуре отбора проб.

8 Приготовление пробы для испытания

Пробы для испытания приготавливают в соответствии со стандартами ИСО 6887 (все части), ИСО 6887-5, ГОСТ 26669 или стандартом, распространяющимся на конкретный продукт. При отсутствии соответствующего стандарта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по этому вопросу.

9 Метод проведения испытания

9.1 Пробы, исходная суспензия и разведения

По ISO 6887 (все части), ГОСТ 26669 или соответствующему стандарту на конкретный продукт.

9.2 Инокуляция и инкубация

9.2.1 В каждую из двух чашек Петри с агаром (5.2.5) переносят с помощью стерильной пипетки (6.7) 0,1 или 0,2 $см^3$ пробы для испытания, если продукт жидкий, или исходную суспензию в случае испытания продукта другой консистенции.

Если необходимо, повторяют процедуру, используя последующие десятичные разведения.

9.2.2 Если, для некоторых продуктов, необходимо определить небольшое количество *B. cereus,* пределы обнаружения могут быть увеличены в 10 раз в результате исследования 1,0 $см^3$ пробы для испытания, если исходный продукт жидкий, или 1,0 $см^3$ исходной суспензии для продуктов других консистенций. В этом случае распределяют 1 $см^3$ инокулята или на поверхности большой чашки Петри (диаметром 140 мм) или на поверхности пяти маленьких чашек (диаметром 90 мм) с помощью стерильного шпателя (6.8). В обоих случаях посевы проводят в двух повторностях, используя две большие чашки или десять маленьких чашек.

9.2.3 Тщательно и быстро распределяют инокулят по поверхности чашки с агаром, не касаясь сторон чашки шпателем (6.8). Используют новый стерильный шпатель для каждой чашки. Оставляют чашки с закрытыми крышками на 15 мин при температуре окружающей среды для впитывания инокулята агаром.

9.2.4 Переворачивают засеянные чашки Петри (9.2.3) и инкубируют их в течение18–24 ч в инкубаторе (6.3) при температуре (30 ± 1) °С. Если после инкубирования выросшие колонии видны неотчетливо, то посевы инкубируют перед подсчетом еще 24 ч.

9.3 Подсчет колоний

После инкубации (9.2.4) отбирают чашки, предпочтительно двух последовательных разведений, содержащие менее 150 колоний.

Подсчитывают презумптивные колонии *B. cereus* на каждой чашке. Презумптивные колонии большие, розового цвета (указывающего на отсутствие ферментации маннита) и обычно окружены зоной выпадения осадка (указывающей на присутствие лецитиназы).

Если на чашках, инокулированных жидким продуктом или наименьшим разведением для продуктов других консистенций, выросло менее 15 характерных колоний, то возможно провести приблизительный подсчет, как описано в разделе 10.

Примечания

1 Если на чашках Петри выросли микроорганизмы, способные ферментировать маннитол с образованием кислоты, то в этом случае характерного розового цвета колоний *B.cereus* может не быть. Колонии могут быть очень бледным или полностью бесцветными.

2 Некоторые штаммы *B. cereus* образуют небольшое количество лецитиназы или совсем ее не образуют.

Колонии этих штаммов не будут окружены зоной выпадения осадка. Такие атипичные колонии также отбирают для подтверждения принадлежности к *B. cereus*.

Если 1,0 см^3 инокулята был распределен на поверхности пяти чашек (9.2.2), то эти чашки считают за одну для последующего подсчета и подтверждения.

9.4 Подтверждение

9.4.1 Отбор колоний для подтверждения

С каждой чашки, отобранной согласно 9.3, отбирают пять типичных или атипичных колоний. Если на чашке менее пяти колоний, берут все имеющиеся колонии. Подтверждают эти колонии, как указано в 9.4.2 – 9.4.5

Если чашки Петри содержат большое количество колоний и нет возможности отобрать хорошо изолированные колонии, то делают посев штрихом пяти колоний на чашки со средой (5.2.4). Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение 18–24 ч.

Отбирают с каждой чашки, по крайней мере, одну хорошо изолированную колонию, окрашенную в розовый цвет. Подтверждают эту колонию, как указано в 9.4.2 – 9.4.5.

9.4.2 Гемолитический тест на агаре с бараньей кровью

Засевают штрихом отобранные колонии (9.4.1) на поверхность агара с бараньей кровью (5.3) так, чтобы можно было правильно интерпретировать гемолитическую реакцию.

Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч и интерпретируют гемолитическую реакцию. Гемолитический тест является арбитражным.

9.4.3 Биохимическая интерпретация

Таблица 1 – Результаты тестов

Наименование тестов	Значение определенных тестов, подтверждающих принадлежность к презумптивным *Bacillus cereus*
MYP агар (9.3)	Образование колоний розового цвета, окруженных осадком
Гемолиз (9.4.2)	Положительная реакция. Ширина гемолитической зоны может варьировать

9.4.4 Окраска по Граму

Для определения отношения микроорганизмов к окраске по Граму из колоний приготавливают мазки, окрашивают их по ГОСТ 30425 и микроскопируют.

В мазках *B. cereus* имеет вид крупных грамположительных палочек размером 1,0–1,2 × 3,0–5,0 мкм со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетообразных скоплений, реже отдельно друг от друга.

B. cereus образует субтерминальные или центральные споры. В живом препарате клетки подвижны или подвижность слабо выражена.

Дополнительный тест на подвижность может помочь дифференцировать *B. cereus* от *B. anthracis* в случае предположения присутствия последних.

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 средой.

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.

Для идентификации возможно проведение окрашивания препаратов по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

9.4.5 Определение редукции нитратов

При проведении не арбитражных испытаний допускается тест на гемолиз заменять тестом на 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 0,2–0,5 см^3 смеси равных объемов растворов, приготовленных по 5.8 и 5.9. 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 контроля отсутствия нитритов в питательной среде допускается использование йодкрахмального реактива по ГОСТ 10444.1

Для подтверждения редукции нитратов проводят посевы в пробирки с нитратной средой. Посевы термостатируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч, затем добавляют 0,2–0,5см^3 смеси равных объемов растворов, приготовленных по 5.8 и 5.9.

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 *B. cereus*, не произошло и тест считают отрицательным. Если после добавления цинка среда не краснеет, то делают вывод о том, что редукция нитратов вследствие присутствия *B. cereus* произошла. Допускается вместо смеси равных объемов растворов, приготовленных по 5.8 и 5.9 использовать растворы, приготовленные по 5.5 и 5.6. В этом случае растворы добавляют из расчета по две капли каждого раствора к 3 см^3 культуральной жидкости или на поверхность плотной среды.

B. cereus вызывают редукцию нитратов.

9.4.6 Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов обнаружены подвижные, грамположительные, спорообразующие палочки, обладающие нитратредуцирующей или гемолитической способностью, не способные ферментировать маннит, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к презумптивным *Bacillus cereus*.

10 Представление результатов

10.1 Подсчет презумптивных *B. cereus*

Подсчет презумптивных *B. cereus* проводят по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ 26670.

Ели две чашки с соответствующей пробой при испытании (жидких продуктов) или исходной суспензии (других продуктов) содержат менее 15 типичных колоний *B. cereus*, то допускается проведение приблизительного подсчета. Результат записывают по ГОСТ 26670 с указанием нижнего и верхнего предела для 95 % доверительного интервала.

10.2 Отсутствие в посевах колоний

Ели две чашки с соответствующей пробой при испытании (жидких продуктов) или исходной суспензии (других продуктов) не содержат типичных колоний *B. cereus*, результат записывают следующим образом:

- менее 1 микроорганизма на кубический сантиметр (жидкие продукты);
- менее 1/*d* микроорганизмов на грамм (другие продукты), где *d* – коэффициент разведения исходной суспензии.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) применяемый метод отбора проб, если известен;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) температуру инкубации;

e) все рабочие подробности, не установленные в настоящем стандарте, или считающиеся необязательными, вместе с подробностями всех инцидентов, которые могли бы повлиять на результат(ы) испытания, указание на метод подсчета презумптивных B. cereus;

f) полученный(ые) результат(ы) испытания.

12 Требования безопасности

Общие требования проведения микробиологического анализа и требования к персоналу – по ГОСТ ISO 7218.

Приложение А
(справочное)

Содержание исключенных пункта 10.3, приложений А и В международного стандарта

А.1 Содержание исключенного пункта 10.3

«10.3 Прецизионность

10.3.1 Межлабораторные испытания

Подробности межлабораторных испытаний, касающиеся прецизионности метода, опубликованы (см. [7] и [8]) и суммированы в приложении В. Пределы повторяемости и воспроизводимости определялись с использованием трех видов пищевых продуктов, загрязненных разными уровнями, с помощью эталонных материалов. Полученные в результате межлабораторных испытаний значения могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от установленных в этом стандарте.

10.3.2 Предел повторяемости

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых однократных испытаний (выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$) (количество *B. cereus* на грамм или кубический сантиметр) или отношение более высокого к более низкому значению из двух результатов по нормальной шкале, полученными за короткий промежуток времени с использованием одного и того же метода на идентичном материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одинаковом оборудовании, не более чем в 5 % случаев будет превышать предел повторяемости *r*.

В качестве общего показателя предела повторяемости (*r*) в процессе испытания проб пищевых продуктов могут использоваться следующие значения:

r = 0,29 (расхождение между результатами, выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$), или

r = 2,0 (отношение между результатами испытания).

Для эталонных материалов (см. [4]), могут применяться следующие значения:

r = 0,12 (расхождение между результатами, выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$), или

r = 1,3 (отношение между результатами испытания).

ПРИМЕР Был получен первый результат испытания 10 000 или 1,0 × 10^4 *B. cereus* на грамм пищевого продукта. При условии повторяемости отношение между первым и вторым результатом не должно превышать 2,0. Поэтому, второй результат будет находиться между 5 000 (= 10 000/2,0) и 20 000 (10 000 × 2,0) *B. cereus* на грамм.

10.3.3 Предел воспроизводимости

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых однократных испытаний (выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$) (количество *B. cereus* на грамм или миллилитр) или отношение более высокого к более низкому из двух результатов по нормальной шкале, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном материале в разных лабораториях разными операторами на различном оборудовании, не более чем в 5 % случаев будет превышать предел воспроизводимости *R*.

В качестве общего показателя предела воспроизводимости (*R*) в процессе испытания проб пищевых продуктов могут использоваться следующие значения:

R = 0,42 (расхождение между результатами выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$), или

R = 2,6 (отношение между результатами испытания).

Для эталонных материалов (см. [4]), могут применяться следующие значения:

R = 0,23 (расхождение между результатами, выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$), или

R = 1,7 (отношение между результатами испытания).

ПРИМЕР 1 В первой лаборатории был получен результат 10 000 или 1,0 × 10^4 *B. cereus* на грамм пищевого продукта. При условии воспроизводимости отношение между результатами, полученными в первой и второй лаборатории, не должно превышать 2,6. Поэтому, результат, полученный во второй лаборатории должен находиться между 3 800 (= 10 000/2,6) и 26 000 (10 000 × 2,6) *B. cereus* на грамм.

ПРИМЕР 2 Лаборатория хочет определить максимальный уровень, который она может получить и который все еще соответствует установленному пределу (например, предел 100 000 или $\log_{10}{10^5}$). Для этого, значение R следует умножить на коэффициент 0,59. Это значение, равное 0,25 (0,42 × 0,59), представлено как расхождение между результатами, выраженными в форме десятичного логарифма $\log_{10}$, или 1,78 ($10^{0,25}$) как отношение между результатами испытания. Таким образом, результаты до $\log_{10}10^{5,25}$= 5,25 ($\log_{10}10^5$= 5 + $\log_{10}10^{0,25}$= 0,25) или 178 000 (100 000 × 1,78) включительно не показывают на несоответствие с пределом. Коэффициент 0,59 отражает тот факт, что испытание с односторонним 95 % доверительным

интервалом применяется, чтобы проверить, превышен ли предел. Коэффициент 0,59 получен из следующей формулы

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

А.2 Содержание исключенного приложения А

«Приложение А
(справочное)

Границы доверительного интервала для небольшого количества колоний

Границы доверительного интервала на уровне 95 % для оценки небольшого количества колоний, когда количество колоний, выросших на чашках, менее 15, приводятся в таблице А.1.

Таблица А.1

Количество колоний	Границы доверительного интервала на уровне 95 %	
	нижняя	верхняя
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

А.3 Содержание исключенного приложения В

«Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Международные совместные испытания, в которых приняли участие 20 лабораторий из 17 стран, проводились на сыре, мясе, сухом картофельном пюре-концентрате и эталонном материале. Каждая проба пищевых продуктов была проанализирована при разных уровнях загрязнения. Испытание, являющееся частью европейского проекта SMT4 CT-96 2098, субсидируемого Европейской Комиссией, проводилось в октябре 1997 г. Национальным институтом здравоохранения (RIVM).

Метод, представленный для межлабораторных испытаний, соответствует требованиям ISO 7932:1993, включая следующие тесты для подтверждения: MYP агаровую среду, глюкозно-агаровую среду, VP среду и нитратную среду.

В соответствии с ISO 5725-1:1994 [5] были определены следующие параметры для представления данных о прецизионности, которые приводятся в таблицах В.1 – В.4.

Таблица В.1 — Результаты анализа данных, полученные на пробах сухого картофельного пюре-концентрата

Параметры	Пробы (уровень загрязнения)		
	Сухое картофельное пюре-концентрат (низкий уровень)	Сухое картофельное пюре-концентрат (средний уровень)	Сухое картофельное пюре-концентрат (высокий уровень)
Количество проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	18	18	18
Число выбросов	0	0	0
Количество принятых проб	36	35	36
Среднее значение $\sum a$ ($\log_{10}$ колониеобразующих единиц/г) (КОЕ/г)	3,3	4,7	6,1
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_r ($\log_{10}$КОЕ/г)	0,09	0,05	0,10
Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости (%)	2,63	1,16	1,60
Предел повторяемости r: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$КОЕ/г)	0,24	0,15	0,27
как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	1,7	1,4	1,9
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,11	0,09	0,10
Относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости (%)	3,24	1,98	1,71
Предел воспроизводимости R: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,30	0,26	0,29
как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	2,0	1,8	2,0

Таблица В.2 — Результаты анализа данных, полученные на пробах рубленого мяса

Параметры	Проба (уровень загрязнения)		
	Рубленое мясо (низкий уровень)	Рубленое мясо (средний уровень)	Рубленое мясо (высокий уровень)
Количество проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	18	18	18
Число выбросов	0	0	0
Количество принятых проб	36	36	36
Среднее значение $\sum a$ ($\log_{10}$ КОЕ/г)	3,1	3,9	4,9
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_r ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,13	0,14	0,08
Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости (%)	4,15	3,49	1,56
Предел повторяемости r:			
как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,36	0,38	0,21
как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	2,3	2,4	1,6
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,15	0,14	0,11
Относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости (%)	4,72	3,49	2,30
Предел воспроизводимости R:			
как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,41	0,38	0,31
как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	2,5	2,4	2,1

Таблица В.3 — Результаты анализа данных, полученные на пробах незрелого сыра

Параметры	Проба (уровень загрязнения)		
	Незрелый сыр (низкий уровень)	Незрелый сыр (средний уровень)	Незрелый сыр (высокий уровень)
Количество проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	12	12	12
Число выбросов	0	0	0
Количество принятых проб	23	23	23
Среднее значение $\sum a$ ($\log_{10}$ КОЕ/г)	3,4	4,1	6,2
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_r ($\log_{10}$КОЕ/г)	0,05	0,06	0,12
Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости (%)	1,50	1,57	1,95

Окончание таблицы В.3

Параметры	Проба (уровень загрязнения)		
	Незрелый сыр (низкий уровень)	Незрелый сыр (средний уровень)	Незрелый сыр (высокий уровень)
Предел повторяемости *r*: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г) как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	0,14 1,4	0,18 1,5	0,33 2,2
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$ КОЕ/г) Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости (%)	0,08 2,28	0,10 2,38	0,17 2,78
Предел воспроизводимости *R*: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г) как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	0,22 1,6	0,27 1,9	0,48 3,0

Т а б л и ц а В.4 — Результаты анализа данных, полученные на стандартном образце

Параметры	Стандартный образец
Количество проб	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	18
Число выбросов	0
Количество принятых проб	36
Среднее значение $\sum a$ ($\log_{10}$КОЕ/г)	3,9
Среднеквадратическое отклонение повторяемости *sr* ($\log_{10}$ колониеобразующих единиц† (КОЕ/г)	0,04
Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости (%)	1,12
Предел повторяемости *r*: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г) как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	0,12 1,3
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}$ КОЕ/г)	0,08
Относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости (%)	2,16
Предел воспроизводимости *R*: как разность по шкале десятичных логарифмов $\log_{10}$ ($\log_{10}$ КОЕ/г) как отношение по нормальной шкале (КОЕ/г)	0,23 1,7

Приложение Б
(справочное)

Перечень технических отклонений

Таблица Б.1

Структурный элемент (раздел, подраздел, пункт, подпункт, таблица, приложение)	Модификация
Раздел 2 Нормативные ссылки	Ссылка на ISO 7218:1996* «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие правила микробиологических исследований» заменена ссылкой на ГОСТ ISO 7218–2011** «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям» Ссылка на ISO 11133-2:2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по определению эффективности питательных сред» заменена ссылкой на ГОСТ ISO 11133-2–2011** «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»
* Заменен на ISO 7218:2007. ** Степень соответствия – IDT.	

Приложение ДВ
(справочное)

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта

Структура международного стандарта		Структура межгосударственного стандарта	
раздел	пункт	раздел	пункт
5	*5.1*	*5*	*5.1*
	5.2		*5.2*
	5.3		*5.3*
	-		*5.4*
	-		*5.4.1*
	-		*5.4.2*
	-		*5.5*
	-		*5.5.1*
	-		*5.5.2*
	-		*5.6*
	-		*5.6.1*
	-		*5.6.2*
	-		*5.7*
	-		*5.7.1*
	-		*5.7.2*
	-		*5.8*
	-		*5.8.1*
	-		*5.8.2*
	-		*5.9*
	-		*5.9.1*
	-		*5.9.2*
	-		*5.10*
9	*9.1*	9	*9.1*
	9.2		*9.2*
	9.3		*9.3*
	9.4		*9.4*
	-		*9.4.4*
	-		*9.4.5*
	-		*9.4.6*
10	*10.3*	-	-
	10.3.1		-
	10.3.2		-
	10.3.3		-
-	-	*12*	-
Приложение А и В	-	-	-

Примечание – Сравнение структур стандартов приведено по разделам 5, 9, 10, 12 и приложениям А и В, так как остальные разделы и их структурные элементы идентичны.

Библиография

[1] MOSSEL, D.A.A., KOOPMAN, M.J. and JONGERIUS, E. *Appl. Microbiol.*, 15, 1967, pp. 650–653
[2] ICMSF. *Microorganisms in foods*, Vol. 1, 2nd edn., University of Toronto Press, 1978
[3] COWELL and MORISETTI *J. Sci. Fd. Agric.*, 20, 1969, p. 573
[4] IN 'T VELD, P.H., SOENTORO, P.S.S. and NOTERMANS, S.H.W. *I. J. Food Microbiol.*, 20, 1993, pp. 23–36
[5] ISO 5725-1:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1:General principles and definitions*
[6] 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*
[7] SCHULTEN, S.M., VAN de LUSTGRAAF, B.E.B., NAGELKERKE, N.J.D. and IN 'T VELD, P.H. *Report No. 286555001*, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, 1998
[8] SCHULTEN, S.M., IN 'T VELD, P.H., NAGELKERKE, N.J.D., SCOTTER, S., DE BUYSER, M.L., ROLLIER, P. and LAHELLEC, C. *I. J. Food Microbiology*, 57, 2000, pp. 53–61

УДК 663/.664:543.9:006.354 МКС 07.100.30 MOD

Ключевые слова: гемолиз, инкубирование посевов, редукция нитратов, ферментация, дефибринированная кровь, окраска по Граму

Подписано в печать 01.09.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 81 экз. Зак. 3911

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru