ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55291— 2023

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 февраля 2023 г. № 76-ст

4 ВЗАМЕН ГОСТ Р 55291—2012

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Методы микробиологического анализа

Probiotic medicine remedies for veterinary use.
Methods of microbiological analysis

Дата введения — 2023—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пробиотические лекарственные средства для ветеринарного применения, пробиотические кормовые добавки, кормовые добавки микробиологического синтеза, закваски и молочные сыворотки, вырабатываемые из отходов молочной промышленности, содержащих пробиотические микроорганизмы, и устанавливает методы микробиологического анализа.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 4919.1 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

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

ГОСТ 10444.11 (ISO 15214:1998) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.12 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10929 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 20730 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

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

ГОСТ 28085 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности

Издание официальное

ГОСТ 29112 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29230 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31659 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ 31928 Средства лекарственные для ветеринарного применения пробиотические. Методы определения пробиотических микроорганизмов

ГОСТ 31929 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 32010 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Shigella

ГОСТ 33222 Сахар белый. Технические условия

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

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ Р 52833 (ИСО 22174:2005) Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **пробиотические лекарственные средства:** Лекарственные средства, содержащие в своем составе живые пробиотические микроорганизмы и применяемые для профилактики и лечения болезней, связанных с нарушением функций нормальной микрофлоры.

3.1.2 **кормовые добавки микробиологического синтеза:** Кормовые добавки, полученные с использованием микроорганизмов-продуцентов.

3.1.3 **пробиотическая кормовая добавка:** Кормовая добавка, содержащая в своем составе пробиотические микроорганизмы.

3.1.4 **бактериологические посевы:** Нанесение (внесение) пипеткой или другим инструментом материала, содержащего микроорганизмы, на (в) питательные среды в целях выделения чистой культуры и определения ее морфологических свойств.

3.1.5 **колонии микроорганизмов:** Видимые невооруженным глазом скопления бактерий или других микроорганизмов на поверхности или в толще плотной питательной среды.

3.1.6 **культивирование:** Методы выращивания микроорганизмов при определенных условиях.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов;

КОЕ — колониеобразующая единица;

ТТХ — 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорид;

EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота.

4 Общие положения

4.1 Общие требования проведения микробиологического анализа — по ГОСТ ISO 7218.

4.2 Требования безопасности

Требования безопасности при работе с микроорганизмами — по [1], [2]; с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019.

Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

4.3 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218.

5 Аппаратура, материалы, посуда, реактивы и культуральные среды

5.1 Для проведения испытаний применяют аппаратуру, материалы, реактивы по ГОСТ 31928, а также:

- автоклав по ГОСТ ISO 7218;
- весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 II класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г (для взвешивания реактивов), с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ±0,01 мг;
- дозатор питательных сред и реактивов по ГОСТ ISO 7218;
- колбы различной вместимости по ГОСТ 25336;
- шкаф ламинарный II класса биологической безопасности;
- посуду одноразового использования для микробиологических исследований по ГОСТ ISO 7218;
- шкаф сушильный по ГОСТ ISO 7218;
- термостат электрический для культивирования микроорганизмов с автоматическим терморегулятором, обеспечивающим поддержание температуры от 20 °С до 55 °С по ГОСТ ISO 7218;
- петлю бактериологическую;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29230;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
- прибор для подсчета колоний по ГОСТ ISO 7218;
- pH-метр с точностью калибровки ±0,1 ед. pH при температуре от 20 °С до 25 °С по ГОСТ ISO 7218;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- стекла покровные по ГОСТ 6672;
- флаконы из темного стекла с притертыми пробками;
- бусы стеклянные;
- парафенилендиамингидрохлорид;
- экстракт мясной;
- лактозу;
- железа (III) гидрат;
- эскумин;
- полимиксин М сульфат;
- полимиксин В сульфат;
- кислоту молочную;
- воду дистиллированную по ГОСТ Р 58144;
- яйца куриные по ГОСТ 31654;
- сахар белый по 33222;
- молоко обезжиренное стерильное;
- плазму кроличью;
- α-нафтол (1-нафтол) по ГОСТ 31659;
- раствор гидроокиси калия;
- калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 2493;
- глюкозу по ГОСТ 6038;
- пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805;
- ТТХ;
- водорода пероксид по ГОСТ 10929;
- раствор пероксида водорода массовой долей 10 % по ГОСТ 31928;

- раствор соляной кислоты массовой долей 5 % по ГОСТ 31928;
- раствор натрия гидроксида массовой долей 50 г/дм^3 по ГОСТ 31928;
- раствор теллурита калия массовой долей 20 г/дм^3 по ГОСТ 31928;
- раствор метиленового синего массовой долей 10 г/дм^3 по ГОСТ 31928 и ГОСТ 4919.1;
- раствор спиртовой массовой долей бромтимолового синего 16 г/дм^3 по ГОСТ 31928 и ГОСТ 4919.1;
- раствор кристаллического фиолетового по ГОСТ 31928 и ГОСТ 4919.1;
- раствор щелочной бромкрезолового пурпурного массовой долей 10 г/дм^3 по ГОСТ 31928 и ГОСТ 4919.1;
- раствор натрия азида массовой долей 100 г/дм^3 по ГОСТ 31928;
- раствор генцианвиолета или кристаллического фиолетового или метилового фиолетового массовой долей 10 г/дм^3 по ГОСТ 31928 и ГОСТ 4919.1;
- раствор антибиотиков по ГОСТ 10444.12;
- раствор натрия хлорида 0,9 %-ный изотонический по [3];
- реактивы для окраски по Граму по ГОСТ ISO 7218;
- реактив для определения цитохромов по ГОСТ 10444.11;
- бриллиантовый зеленый;
- феноловый красный;
- метиловый красный;
- метиленовый синий;
- дрожжевой экстракт;
- N-ацетилпиридиний хлорид;
- EDTA;
- парадиметиламинобензальдегид;
- концентрированная фосфорная кислота;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- XLD-агар (ксилоза-лизин-деоксихолатный агар) по ГОСТ 32010;
- среды для культивирования бактерий семейства *Enterobacteriaceae,* в том числе бактерий рода *Proteus:*
- цитратный агар Симмонса сухой промышленного производства;
- бульон глюкозо-фосфатный сухой промышленного производства;
- среда Эндо по прописи, указанной на этикетке;
- мясо-пептонный агар (МПА) по ГОСТ 29112;
- висмут-сульфитный агар по прописи, указанной на этикетке;
- агар Плоскирева по прописи, указанной на этикетке;
- агар с эозином и метиленовым голубым (Левина) по прописи, указанной на этикетке;
- агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным по 7.4.1;
- среда (типа Клиглера) для первичной дифференциации энтеробактерий, сухая промышленного производства;
- бульон мясо-пептонный с триптофаном по 7.4.8;
- среда Кларка по 7.4.9;
- среда Козера по 7.4.10;
- среды с углеводами (среды Гисса) по 7.4.11;
- трехсахарный агар по 7.4.12;
- забуференная пептонная вода по 7.4.13;
- среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) по ГОСТ 31659;
- селенитовая среда по 7.4.15;
- тетратионатная среда (Мюллер-Кауфман) по 7.4.16;
- тест-системы для биохимической идентификации промышленного производства;
- среды для культивирования осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов:
  - среда агаризованная для выделения дрожжей по ГОСТ 31928,
  - солодовое агаризованное сусло с сахарозой по 7.4.2,
  - среда Сабуро по ГОСТ 28085,
  - среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* по 7.4.3;

- среды для культивирования бактерий рода *Staphylococcus*:
  - солевой агар с ТТХ по 7.4.4,
  - агар Байрд-Паркера по 7.4.5,
  - желточно-солевой агар (ЖСА) по 7.4.6,
  - молочно-желточный солевой агар (МЖСА) по 7.4.7;
- среда для определения КМАФАнМ по 7.4.17;
- бульон Хоттингера по ГОСТ 10444.1.

5.2 В качестве экспресс-методов выявления микроорганизмов и/или подтверждения их принадлежности к тому или иному виду допускается использование тест-систем в виде подложек или пластин, содержащих набор питательных веществ и герметично закрытых непроницаемой мембраной; иммунохроматографических экспресс-тестов; бактериологических анализаторов (например, основанных на принципе импеданса); метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ГОСТ Р 52833. Проведение анализа и учет результатов с использованием таких методов проводят по инструкции производителя.

5.3 Допускается использовать готовые и сухие (дегидратированные) культуральные питательные среды, предназначенные для указанных целей, по характеристикам и качеству не ниже указанных, а также среды, приготовленные по прописи производителя.

5.4 Инструменты и поверхность приборов, непосредственно соприкасающихся с анализируемыми образцами, должны быть простерилизованы в соответствии с [4].

5.5 Допускается применять средства измерений, аппаратуру, посуду, материалы и реактивы по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже вышеуказанных.

5.6 Вместо оборудования и материалов многократного использования (чашки Петри, флаконы, пипетки, пробирки, бутылки) допускается использовать одноразовое оборудование и материалы, если они аналогичны по техническим характеристикам, подходят для использования в микробиологии и не содержат веществ, подавляющих рост микроорганизмов.

6 Сущность метода

Метод основан на определении посторонних микроорганизмов и грибов при высеве определенного количества пробиотических лекарственных средств (пробиотических кормовых добавок, кормовых добавок микробиологического синтеза, заквасок, молочных сывороток) для ветеринарного применения и (или) их разведений в жидкие или агаризованные селективные питательные среды и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и грибов и их подсчете.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Подготовка посуды и материалов — по ГОСТ ISO 7218.

7.2 Отбор и подготовка проб — по ГОСТ 31929, ГОСТ 31928 и ГОСТ ISO 7218.

7.3 Приготовление растворов, реактивов и индикаторов

7.3.1 Приготовление раствора N, N, N', N'-тетраметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида массовой долей 10 г/дм^3

1 г реактива переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят холодной дистиллированной водой до метки.

Реактив готовят непосредственно перед применением.

7.3.2 Приготовление раствора ТТХ массовой долей 10 г/дм^3

1 г ТТХ переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят дистиллированной водой до метки и стерилизуют методом мембранной фильтрации.

Срок хранения раствора в темной плотно закрытой посуде при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

7.3.3 Приготовление индикаторных бумажек для обнаружения индола

3—5 г парадиметиламинобензальдегида, 10 см^3 концентрированной фосфорной кислоты и 50 см^3 этилового спирта тщательно перемешивают в фарфоровой ступке. В полученном растворе смачивают полоски фильтровальной бумаги, высушивают и нарезают узкими полосками шириной около 1 см. Цвет полученных бумажек — желтый. Индикаторные бумажки хранят не более 1 мес в темном месте.

7.3.4 Приготовление спиртового раствора α-нафтола (1-нафтола) по ГОСТ 31619.

7.3.5 Приготовление раствора гидроокиси калия массовой концентрации 400 г/дм^3

40 г гидроокиси калия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

7.3.6 Приготовление реактива Кларка

0,1 г метилового красного растворяют в 300 см^3 этилового спирта и добавляют 200 см^3 дистиллированной воды. Реактив хранят в посуде из темного стекла не более 1 мес при температуре от 2 °С до 8 °С.

7.3.7 Приготовление раствора бриллиантового зеленого концентрации 5 г/дм^3

0,5 г бриллиантового зеленого переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор хранят в закрытом сосуде из темного стекла при комнатной температуре не более 3 мес.

7.4 Приготовление питательных сред

Приготовление питательных сред и их проверка перед использованием должны соответствовать требованиям ГОСТ ISO 11133.

Подготовка питательных сред перед использованием — по ГОСТ 31928.

7.4.1 Агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным

3,0 г мясного экстракта, 10,0 г пептона, 10,0 г лактозы, 5,0 г хлористого натрия, 0,5 г фосфорнокислого двузамещенного калия, 15,0 г агар-агара переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой. Допускается использовать мясо-пептонный бульон по ГОСТ 20730. Смесь нагревают до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры 45 °С — 55°С, устанавливают значение pH (7,2 ± 0,1) при температуре 25 °С. Среду стерилизуют в течение 20 мин при температуре (115 ± 1) °С, затем охлаждают до температуры 45 °С — 55 °С и добавляют 40 см^3 раствора фенолового красного и 2 см^3 раствора бриллиантового зеленого, тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри, колбы или флаконы. Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.4.2 Солодовое агаризованное сусло с сахарозой

7.4.2.1 Приготовление солодового сусла с сахарозой: к 500 см^3 солодового сусла добавляют 420,0 г сахара по ГОСТ 33222, нагревая, перемешивают до полного его растворения, фильтруют, охлаждают до температуры (50 ± 5) °С. Устанавливают с помощью молочной кислоты pH таким образом, чтобы при температуре 25 °С он составлял (3,6 ± 0,1) ед. pH. Сусло с сахарозой разливают по 60 см^3 в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

7.4.2.2 Приготовление агаризованного сусла: к 500 см^3 солодового сусла (3,6 ± 0,1) ед. pH добавляют 30,0 г агара, нагревают, при перемешивании расплавляют агар. Среду фильтруют и разливают по 40 см^3 в колбы, затем стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

7.4.2.3 Непосредственно перед посевом агаризованное сусло расплавляют на водяной бане, а солодовое сусло сахарозой нагревают до температуры (50 ± 5) °С и две эти части смешивают. Питательную среду разливают по 100 см^3 в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Срок хранения готовой среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.4.3 Среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*

К мясо-пептонному агару (МПА) добавляют 0,2 %-ный N-ацетилпиридиния хлорид, подавляющий рост посторонних микроорганизмов.

Для приготовления среды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 20,0 г ферментативного сухого пептона, 7,0 г сернокислого калия, 1,5 г хлористого магния, 1,5 г сернокислого магния, 2,0 г N-ацетилпиридиния хлорида, 10,0 г агар-агара, доводят дистиллированной водой до метки, кипятят в течение 2—3 мин до расплавления агара, разливают в чашки Петри. Кислотность среды — (6,8—7,0) ед. pH.

Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.4.4 Солевой агар с ТТХ

Сухой питательный агар по прописи на этикетке и 65 г натрия хлорида расплавляют при нагревании в 1000 см^3 дистиллированной воды. Осадок отфильтровывают, разливают равномерно во флаконы, стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленную основу из расчета на 100 см^3 добавляют: 1 г D-глюкозы, 2 см^3 дрожжевого экстракта, 1 см^3 водного 1 %-ного раствора ТТХ. Тщательно перемешивают, разливают в чашки Петри.

Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

7.4.5 Агар Байрд-Паркера

63,0 г порошка агара тщательно размешивают в 950 $см^3$ дистиллированной воды и кипятят до полного растворения частиц. Стерилизуют автоклавированием при температуре (120 ± 2) °С в течение 15 мин. К охлажденной до температуры 50 °С среде в асептических условиях добавляют 50 $см^3$ концентрированной суспензии яичного желтка и 3 $см^3$ стерильного 3,5 %-ного раствора теллурита калия или 50 $см^3$ желточно-теллуритовой эмульсии. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Срок хранения среды в защищенном от света и высыхания месте при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

7.4.6 Желточно-солевой агар (ЖСА)

Сухой питательный агар по прописи на этикетке и 65 г натрия хлорида растворяют при нагревании в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, разливают равномерно в емкости, стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленный и остуженный до температуры 50 °С — 55 °С солевой агар добавляют один стерильно приготовленный яичный желток, тщательно смешанный с 50 $см^3$ физиологического раствора с помощью стеклянных бус, перемешивают и разливают в чашки Петри тонким слоем.

Срок хранения среды в защищенном от света и высыхания месте при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

7.4.7 Молочно-желточный солевой агар (МЖСА)

Основой среды является 1,8 %-ный питательный агар, содержащий 7,5 г натрия хлорида на 100 $см^3$ среды. К 200 $см^3$ растопленного и охлажденного до 50 °С агар-агара добавляют молочно-желточную смесь, которую готовят следующим образом: во флаконе с 20 $см^3$ стерильного обезжиренного молока эмульгируют (со стеклянными бусами) 2 $см^3$ яичного желтка. После добавления смеси в агар среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовая среда содержит 10 % стерильного обезжиренного молока и 1 % яичного желтка.

Срок хранения готовой среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 7 сут.

7.4.8 Бульон мясо-пептонный с триптофаном

0,05 г *L*-триптофана растворяют в 100 $см^3$ мясо-пептонного бульона, приготовленного по ГОСТ 10444.1, разливают в пробирки по 6—7 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.4.9 Среда Кларка

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды при нагревании растворяют 5,0 г пептона, 5,0 г глюкозы, 5,0 г фосфорнокислого двузамещенного калия, охлаждают до 45 °С — 55 °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,2 ± 0,1) при 25 °С. Среду разливают по 5—6 $см^3$ в пробирки и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин или дробным методом — текучим паром по 30 мин три дня подряд. Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

7.4.10 Среда Козера

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды при нагревании растворяют 1,5 г фосфорнокислого двузамещенного натрия-аммония, 1,0 г фосфорнокислого однозамещенного калия, 0,2 г сернокислого магния и 2,5 г лимоннокислого натрия, охлаждают до 45 °С — 55 °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,2 ± 0,1) при 25 °С. Среду стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. После стерилизации к 1 $дм^3$ среды добавляют 10 $см^3$ спиртового раствора бромтимолового синего массовой концентрации 5 $г/дм^3$, затем среду разливают по 6—7 $см^3$ в стерильные пробирки. Приготовленная среда имеет оливково-зеленый цвет. Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

7.4.11 Среды с углеводами (среды Гисса) готовят по ГОСТ 10444.1 или используют для приготовления сухие среды промышленного производства.

7.4.12 Трехсахарный агар готовят по ГОСТ 31659.

7.4.13 Забуференная пептонная вода

10,0 г пептона, 5,0 г хлористого натрия, 9,0 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 1,5 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют при нагревании в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял (7,0 ± 0,1) при температуре 25 °С. Разливают по колбам в количестве, зависящем от навески анализируемого продукта (если навеска равна 25 г, то разливают по 225 $см^3$, то есть 1:9), и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

7.4.14 Среду Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) готовят по ГОСТ 31659.

7.4.15 Селенитовая среда

Среду готовят из двух растворов. Приготовление раствора 1: 5,0 г пептона, 7,0 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия, 3,0 г безводного однозамещенного фосфорнокислого натрия, 4,0 г лактозы растворяют при нагревании в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, охлаждают до температуры 45 °С — 55 °С, если необходимо, путем изменения соотношения фосфатных солей устанавливают pH (7,0 ± 0,1). Среду разливают по 100 $см^3$ в колбы или флаконы и стерилизуют текучим паром по 30 мин в течение двух дней или при температуре (112 ± 1) °С в течение 30 мин.

Приготовление раствора 2: 10,0 г кислого селенистокислого натрия ($NaHSeO_3$) растворяют асептически в 100 $см^3$ стерильной дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Приготовление среды: к 100 $см^3$ раствора 1 прибавляют 4 $см^3$ раствора 2.

Стерилизация приготовленной среды не допускается, так как при этом происходит редукция кислого селенистокислого натрия, выпадает осадок красного цвета, и среда становится непригодной.

Селенитовая среда выпускается в сухом виде и готовится по прописи, указанной на этикетке. Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.4.16 Тетратионатная среда (Мюллер-Кауфман)

Приготовление основы среды: в 100 $см^3$ мясо-пептонного бульона, приготовленного по ГОСТ 10444.1, помещают 4,5 г стерильного углекислого кальция. Углекислый кальций стерилизуют по ГОСТ 10444.1.

Приготовленную основу стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

При приготовлении среды к 100 $см^3$ основы среды асептически прибавляют:

- 10 $см^3$ раствора гипосульфита натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$);
- 2 $см^3$ йодного раствора;
- 0,2 $см^3$ раствора бриллиантового зеленого;
- 5 $см^3$ раствора желчи.

Указанные растворы прибавляют к основе среды в приведенном выше порядке, перемешивая смесь после каждого прибавления.

Среду допускается использовать в течение одной недели после приготовления.

Указанные выше растворы, добавляемые к основе среды, готовят следующим образом:

- раствор гипосульфита натрия: 50,0 г гипосульфита натрия помещают в колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор переливают в колбу или флакон и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин или при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин;
- йодный раствор: 25,0 г йодистого калия помещают в колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, прибавляют 20,0 г кристаллического йода, растворяют его. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

Раствор хранят в плотно закрытом темном сосуде;

- раствор бриллиантового зеленого готовят по 7.3.7;
- раствор желчи: 10,0 г сухой желчи растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды или используют натуральную желчь. Раствор желчи или натуральную желчь стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин. Срок хранения среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

7.4.17 Среда для определения КМАФАнМ

Для приготовления среды в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ смешивают 35,0 г сухого питательного агара, 2,5 г дрожжевого экстракта, 1,0 г *D*-глюкозы, доводят дистиллированной водой до метки, устанавливают pH (7,0 ± 0,1) и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Срок хранения готовой среды при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 14 сут.

8 Методы посева и культивирования

8.1 Метод посева на твердые питательные среды в чашках Петри — по ГОСТ 31928 и ГОСТ ISO 7218.

8.2 Метод культивирования — по ГОСТ ISO 7218.

9 Основные методы идентификации микроорганизмов

9.1 Окрашивание по Граму проводят в соответствии с ГОСТ ISO 7218.

9.2 Проба на каталазу

Обнаружение каталазы, которая разлагает перекись водорода (H_2O_2) на воду и кислород, проводят, используя бульонную культуру или отдельную колонию на агаровой среде. Если в конкретных стандартах на методы анализа не установлены другие требования, то во всех случаях питательная среда не должна содержать кровь. Исключение составляет кровь, подвергшаяся термической обработке (среда с вареной кровью). В случае анаэробных бактерий перед добавлением перекиси (пероксида) водорода культуру выдерживают 30 с на открытом воздухе.

9.3 Проба на каталазу с колонией

На предметное стекло наносят отдельно две капли раствора перекиси (пероксида) водорода массовой долей 3 %. Отделяют колонию от среды стерильным стеклом или пластиковой палочкой (но не металлической иглой) и осторожно диспергируют ее в одной из капель. Немедленно, а также через несколько минут (но не менее 1 мин) отмечают отсутствие или образование пузырьков кислорода. В сомнительном случае покрывают обе капли предметным стеклом и сравнивают наличие пузырьков в обеих каплях. Наблюдения проводят визуально или с помощью микроскопа при малом увеличении.

9.4 Проба на оксидазу

9.4.1 Обнаружение оксидазы проводят по окрашиванию компонентов вследствие окисления N, N, N', N'-тетраметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида под действием фермента.

9.4.2 Проведение анализа и интерпретация результатов

Увлажняют кусок фильтрованной бумаги раствором по 7.3.1. Отбирают пробу бактериальной культуры с агаровой среды, на которой ее выращивали, с помощью платиновой иглы, стеклянной или пластиковой палочки (никель-хромовая игла дает ошибочные положительные результаты). Пробу помещают на увлажненную фильтрованную бумагу.

В случае присутствия оксидазы через 5—10 с появляется окрашивание от фиолетового до пурпурного цвета. Если после 10 с цвет не изменился, проба на оксидазу считается отрицательной.

9.5 Проба на лецитиназу

Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют на желточно-солевом агаре (ЖСА). Пробу бактериальной культуры с агаровой среды с помощью стерильной платиновой петли пересевают на желточно-солевой агар. Культивируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. На плотной питательной среде вокруг колоний, вырабатывающих активную лецитиназу, просматривается широкая беловатая непрозрачная радужная зона.

9.6 Проба на коагулазу

9.6.1 Проба на коагулазу, используемая для идентификации патогенных стафилококков, основывается на выявлении бактериального фермента коагулазы, который разрушает фибриноген и растворяет сгустки крови. Используют сухую кроличью плазму промышленного производства с цитратом натрия или EDTA.

9.6.2 Проведение анализа и интерпретация результатов

9.6.2.1 Слайд-тест («хлопьеобразующий фактор»)

На стекло наносят одну каплю кроличьей плазмы, суспензируют в ней бактериальные колонии стафилококков и наблюдают за реакцией в течение 10 с.

Альтернативный способ: на стекле готовят густую суспензию культуры в дистиллированной воде, тщательно гомогенизируют, чтобы исключить спонтанное склеивание. Добавляют одну каплю кроличьей плазмы и, дополнительно не перемешивая, наблюдают за образованием хлопьев в течение 10 с.

При положительной реакции образуются хлопья, которые не смешиваются в однородную суспензию. При отрицательной реакции хлопья не образуются и суспензия остается гомогенной. Эталонным штаммом служит тест-штамм *Staphylococcus aureus.*

9.6.2.2 Пробирочный тест

Засевают изолированную колонию стафилококка в пробирку с 0,5 $см^3$ кроличьей плазмы. Пробирки с заранее разлитой кроличьей плазмой могут храниться в холодильнике до 10 сут или в замороженном состоянии до нескольких месяцев. Инкубируют при температуре 35 °С — 37 °С до 24 ч.

Первое наблюдение проводят через 4 ч инкубации на наличие желе или сгустка, который не разрушается при легком встряхивании.

Если сгусток появляется через 4 ч, пробирки оставляют до следующего утра при комнатной температуре, чтобы избежать его растворения за счет стрептокиназоподобной активности анализируемой культуры стафилококка.

Если сгусток отсутствует, посевы инкубируют повторно в течение 24 ч и затем анализируют повторно.

При наличии патогенных стафилококков наблюдается положительный результат — любое образование сгустка через 4 ч или 24 ч. При отрицательном результате сгусток не образуется, плазма свободно растекается при наклоне пробирки, то есть патогенные стафилококки отсутствуют.

10 Методы выявления бактерий и грибов

10.1 Метод выявления бактерий рода *Proteus*

10.1.1 Проведение анализа

Для выявления бактерий рода *Proteus* в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, кормовой добавке микробиологического синтеза, закваске, молочной сыворотке) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред: цитратного агара Симмонса, среды Эндо, мясо-пептонного агара по ГОСТ 29112, висмут-сульфитного агара, агара Плоскирева, агара с эозином и метиленовым голубым (агар Левина), лактозного агара с бриллиантовым зеленым и феноловым красным по 7.4.1.

Для получения чистых культур *Proteus* используют посев по Шукевичу (в конденсационную жидкость скошенного питательного агара).

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч — окончательный.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Proteus.*

Бактерии рода *Proteus* на средах образуют белые роящиеся колонии. На среде Плоскирева образуют крупные, диаметром 2—3 мм, полупрозрачные изолированные колонии правильных очертаний с желтовато-розоватым оттенком. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч культивирования колонии бактерий рода *Proteus* имеют грязно-коричневый цвет, а после их снятия на среде остается темно-коричневая зона.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1 и делают пробу на каталазу по 9.2. В мазках, окрашенных по Граму, бактерии рода *Proteus* имеют форму палочек размером 1,0—3,0 · 0,4—0,6 мкм; кокковидные или неправильные инволюционные формы грамотрицательные. Клетки могут образовывать пары или цепочки, капсул не образуют. Все представители рода *Proteus* каталазоположительные.

10.1.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамположительные микроорганизмы, дающие на агаризованных средах характерный рост в виде роящихся колоний, то их относят к бактериям рода *Proteus.*

10.2 Метод выявления бактерий рода *Pseudomonas*

10.2.1 Проведение анализа

Для выявления бактерий рода *Pseudomonas* в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, кормовой добавке микробиологического синтеза, закваске, молочной сыворотке) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред: по 7.4.3, мясо-пептонного агара, агара Плоскирева.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Pseudomonas.*

Бактерии рода *Pseudomonas* образуют синие или зеленовато-синие или фиолетовые пигменты, проникающие в субстрат.

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты и окрашивают по Граму по 9.1. В мазках, окрашенных по Граму, бактерии рода *Pseudomonas* представлены грамотрицательными палочками размером 1,5—3,0 · 0,4—0,6 мкм, располагающимися одиночно, парами или короткими цепочками, не образующими спор, но продуцирующими слизь, окружающую микробную клетку тонким слоем.

10.2.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамотрицательные микроорганизмы, дающие на агаризованных средах характерный рост в виде колоний, образующих синий, зеленовато-синий или фиолетовый пигмент, то их относят к бактериям рода *Pseudomonas.*

10.3 Метод выявления бактерий рода *Staphylococcus*

10.3.1 Проведение анализа

Метод основан на способности микроорганизмов рода Staphylococcus расти на питательных средах с повышенным содержанием хлорида натрия.

Для выявления бактерий рода *Staphylococcus* в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, кормовой добавке микробиологического синтеза, закваске, молочной сыворотке) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.4—7.4.7.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч — окончательный.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Staphylococcus.*

При необходимости идентификации из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1 и делают пробу на каталазу по 9.2 и (или) коагулазу по 9.6. В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются поодиночке, парами или в виде скоплений (гроздей) грамположительных кокков неправильной формы. Размеры микробных клеток у стафилококков 0,5—1,5 мкм. Стафилококки относятся к каталазоположительным микроорганизмам.

10.3.2 Обработка результатов

Результаты оценивают визуально по каждой анализируемой пробе отдельно.

Если при анализе культуральных и морфологических свойств обнаружены каталазоположительные грамположительные микроорганизмы, дающие на агаризованных селективных средах характерный рост в виде круглых, выпуклых, с ровными краями колоний от белого до золотисто-желтого цвета, располагающиеся в мазках, окрашенных по Граму, в виде овоидных клеток, собранных парами или скоплениями, то их относят к бактериям рода *Staphylococcus.*

Если на средах обнаружены каталазоположительные светло-желтые или золотистые колонии, образующие зону преципитации и зону плазмокоагуляции, а в мазках, окрашенных по Граму, выявлены овоидные клетки, собранные парами или скоплениями, то их относят к бактериям рода *Staphylococcus*, виду *S. aureus.*

10.4 Метод выявления осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов

10.4.1 Проведение анализа

Для выявления осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, кормовой добавке микробиологического синтеза, закваске, молочной сыворотке) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.2, агаризованной среды для выделения дрожжей по ГОСТ 31928 и среды Сабуро.

Посевы инкубируют в течение 5 сут при температуре (23 ± 1) °С или (32 ± 1) °С. Через трое суток проводят предварительную оценку результатов инкубирования посевов, а через 5 сут — окончательную.

10.4.2 Обработка результатов

Для определения количества осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов выбирают те разведения, при посеве которых на чашках Петри вырастает не менее 15 и не более 150 колоний для дрожжей и не менее 5 и не более 50 для плесневых грибов.

Колонии осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально.

Рост осмотолерантных дрожжей на агаризованных питательных средах сопровождается образованием выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Рост осмотолерантных плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

При необходимости для разделения дрожжей и плесневых грибов проводят микроскопические исследования. Для этого из отдельных колоний готовят мазки и окрашивают их раствором метиленового синего. На подсушенный мазок наносят раствор метиленового синего, выдерживают 5 мин, сливают краску, высушивают на воздухе и микроскопируют для определения дрожжевых клеток или гифов плесневых грибов.

10.5 Методы выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

Колиформные бактерии — грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. При микробиологическом контроле пробиотических препаратов (пробиотических кормовых добавок, кормовых добавок микробиологического синтеза, заквасок, молочных сывороток) можно ограничиваться обнаружением бактерий из группы кишечной палочки без их биохимической дифференциации.

10.5.1 Проведение анализа

Для выявления колиформных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в анализируемом препарате (пробиотической кормовой добавке, кормовой добавке микробиологического синтеза, закваске, молочной сыворотке) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность одной из предварительно подсушенных агаризованных питательных сред по 7.4.1, цитратного агара Симмонса, среды Эндо, мясо-пептонного агара, висмут-сульфитного агара, агара Плоскирева, агара Левина. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч — окончательный.

Посевы на агаризованных средах после инкубирования просматривают и отмечают рост характерных колоний. Они могут быть окрашены в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные энтеробактерии), бесцветными (лактозоотрицательные), могут приобретать розоватый или сероватый оттенок с более или менее выраженным темным центром, особенно у более крупных колоний. Диаметр и окраска колоний могут варьироваться не только в зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем диаметр колоний составляет 1—2 мм. Представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter* чаще образуют слизистые розовые колонии диаметром 2—3 мм. *Shigella, Salmonella, Hafnia* — нерояющиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров.

На лактозном агаре с бриллиантовым зеленым и феноловым красным колиформные бактерии образуют ярко-желтые колонии диаметром 2—4 мм с желтой прозрачной зоной диаметром 1—3 мм вокруг колонии.

На среде Эндо колонии бактерий семейства *Enterobacteriaceae* обычно выпуклые, с правильными очертаниями (круга), в разной степени опалесцирующие, иногда слизистые, темно-красные с металлическим блеском или розово-красные без блеска, на агаре Плоскирева — кирпично-красные с глянцевой поверхностью, на среде Левина — черные с металлическим блеском, темные с черным центром, темно-фиолетовые или фиолетово-черные с темным центром блестящие колонии. Из колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму: при микроскопии обнаруживают грамотрицательные палочки различной величины.

Бактерии рода *Salmonella* на висмут-сульфит агаре образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колонией; на среде Плоскирева — колонии бесцветные прозрачные, на среде Эндо — колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные; на среде Левина — колонии прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

На среде Симмонса растут бактерии, способные усваивать цитратно-аммонийные соли с образованием синего цвета. К ним относят энтеробактерии родов *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella.*

При необходимости подтверждения принадлежности выросших микроорганизмов к колиформным бактериям из чашек Петри с посевами отбирают не менее пяти колоний, из которых приготавливают мазки и окрашивают их по Граму.

Колиформные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными палочками.

При необходимости определяют наличие оксидазы по 9.4. Часть отдельной колонии наносят платиновой петлей или стеклянной палочкой на фильтровальную бумагу, смоченную в одном из реактивов.

При применении раствора N, N, N', N'-тетраметил-пара-фенилендиамина дигидрохлорида положительная реакция проявляется появлением пурпурной окраски в течение 10 с.

При применении реактива на основе α-нафтола положительная реакция проявляется появлением синей окраски в течение 60 с.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* не обладают активной оксидазой, поэтому изменения окраски не происходит.

10.5.2 Метод выявления бактерий вида *Escherichia coli*

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к виду *Escherichia coli* навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 на поверхность среды Эндо.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

Посевы на агаризованной среде Эндо просматривают после инкубирования и отмечают рост характерных для *E.coli* колоний.

На среде Эндо *E.coli* образуют колонии от бледно-розового до темно-красного цвета, часто с металлическим блеском.

Для дальнейшего подтверждения принадлежности выросших колоний к *Escherichia coli* отбирают по три колонии каждого типа.

Из отобранных колоний приготавливают мазки, окрашивают их по Граму. Параллельно в каждой отобранной колонии у бактерий определяют отсутствие оксидазы.

Оксидазоотрицательные бактерии пересевают на поверхность мясо-пептонного агара или среды, приготовленной из сухого питательного агара. Посевы инкубируют до появления видимого роста при температуре (37 ± 1) °С.

У оксидазоотрицательных грамотрицательных культур (палочки размером 1,1—1,5 · 2—6 мкм), выросших в пересевах на агаре МПА, определяют возможность образования индола, ацетоина, сероводорода, утилизации цитрата, интенсивность ферментации углеводов с образованием кислоты, ферментацию сорбита, глюкозы и лактозы.

Для биохимической идентификации выявленных бактерий допускается использование тест-систем промышленного производства.

При необходимости идентификацию выявленных бактерий проводят по биохимическим признакам.

10.5.2.1 Определение образования индола

Культуру высевают в пробирку с бульоном Хоттингера или мясо-пептонным бульоном с триптофаном по 7.4.8. Под пробку в пробирку помещают полоску индикаторной бумажки, приготовленной по 7.3.3. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Если за время инкубирования посевов в среде накапливается индол, то желтый цвет индикаторной бумажки меняется на цвет от сиренево-розового до интенсивного малинового — *E.coli* образует индол.

10.5.2.2 Определение образования ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра)

Культуру высевают в пробирки со средой Кларка, приготовленной по 7.4.9. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

После инкубирования посевов к 1 $см^3$ отобранной культуральной жидкости прибавляют 0,6 $см^3$ раствора α-нафтола, приготовленного по 7.3.4, и 0,2 $см^3$ раствора гидроокиси калия, приготовленного по 7.3.5. После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Проявление розового окрашивания через 15—60 мин указывает на положительную реакцию — *E.coli* не образует ацетоин.

10.5.2.3 Определение утилизации цитрата

Культуру высевают в пробирки со средой Козера, приготовленной по 7.4.10, или на поверхность среды Симмонса. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Изменение оливково-зеленого цвета сред на васильковый, синий указывает на положительную реакцию — *E.coli* не утилизирует цитрат.

10.5.2.4 Определение интенсивности ферментации углеводов с образованием кислоты (реакция с метил-рот)

Культуру высевают в пробирки с глюкозо-фосфатным бульоном или средой Кларка по 7.4.9 или используют посевы после отбора 1 $см^3$ культуральной жидкости (см. реакция Фогес-Проскауэра). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. К 5 $см^3$ культуральной жидкости прибавляют 5—10 капель реактива Кларка, приготовленного по 7.3.6. Появление через 1 мин красного цвета культуральной жидкости указывает на ферментацию углеводов до pH ниже 5,0.

E. coli интенсивно ферментирует углеводы — реакция с метил-рот положительная.

10.5.2.5 Определение ферментации сорбита, глюкозы и лактозы

Культуру высевают в среды Гисса с сорбитом, глюкозой или лактозой, приготовленные по 7.4.11. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч, а на среде Гисса с лактозой — при температуре (43 ± 1) °С в течение 24 ч.

E. coli ферментирует глюкозу, лактозу и сорбит.

При ферментации глюкозы образуется газ. Ферментацию глюкозы можно учитывать в засеянных косяках трехсахарного агара по 7.4.12 или среды Клиглера по изменению цвета столбика среды и образованию в нем газа.

Ферментацию лактозы учитывают по изменению цвета скошенной поверхности среды Клиглера.

Ферментацию сорбита учитывают по изменению цвета среды.

У культур, типичных для *E. coli* по всем изученным признакам, но не ферментирующим сорбит, изучают возможность ферментации целлобиозы на среде, приготовленной по 7.4.11, при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. *E. coli* не ферментирует целлобиозу, цвет среды не меняется.

10.5.2.6 Определение образования сероводорода

Образование сероводорода учитывают в посевах на среду Клиглера или трехсахарный агар по 7.4.12 после инкубирования посевов при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Почернение в столбике среды указывает на образование сероводорода.

E. coli не образует сероводород.

10.5.3 Метод выявления бактерий рода *Salmonella*

10.5.3.1 Неселективное предварительное обогащение

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к роду *Salmonella* навеску продукта, в массе (объеме) которой нормативно-технической документацией на анализируемый продукт предусматривается отсутствие бактерий рода *Salmonella, в*ысевают в забуференную пептонную воду, приготовленную по 7.4.13. Соотношение массы (объема) продукта и забуференной пептонной воды 1:9.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 2) ч.

10.5.3.2 Селективное обогащение

Культуры, полученные после инкубирования по 10.5.3.1, пересевают в среды для селективного обогащения. Для этого по 1 $см^3$ культуры пересевают в 10 $см^3$ *RVS*-бульона и в 10 $см^3$ селенитовой среды или в 10 $см^3$ тетратионатного бульона Мюллера-Кауфмана.

Посевы на RVS-бульоне инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч, а на тетратионатном бульоне и селенитовой среде посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

10.5.3.3 Пересев на чашки и идентификация

Культуры через 24 ч инкубирования на селективных средах пересевают (так, чтобы получить хорошо изолированные колонии) на XLD-агар и на одну из агаризованных сред: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева, среду Эндо, среду Левина или бриллиантовый зеленый агар.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С.

После инкубирования в течение (24 ± 3) ч, а на бриллиантовом зеленом агаре — 48 ч, просматривают чашки и отмечают присутствие типичных колоний бактерий рода *Salmonella* и атипичных колоний, которые могут быть бактериями рода *Salmonella*. Отмечают их местоположение на дне чашки.

Типичные колонии бактерий рода *Salmonella,* вырастающие на *XLD*-агаре, имеют черный центр и слегка прозрачную зону красноватого цвета, что принадлежит цвету индикатора, лактозоположительные бактерии рода *Salmonella* на *XLD*-агаре образуют желтые колонии с почернением или без него.

На висмут-сульфит агаре бактерии рода *Salmonella* образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колониями.

На среде Эндо бактерии рода *Salmonella* образуют круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные колонии.

На среде Плоскирева бактерии рода *Salmonella* образуют бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо, колонии.

На среде Левина бактерии рода *Salmonella* образуют прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

На бриллиантовом зеленом агаре бактерии рода *Salmonella* образуют красноватые или розовые, почти белые колонии (их цвет зависит от штамма и срока инкубирования). Лактозоположительные и сахарозоположительные микроорганизмы образуют зеленоватые колонии, окруженные яркой желто-зеленой зоной.

Отсутствие в посевах на селективно-диагностических средах типичных и атипичных колоний для бактерий рода *Salmonella* свидетельствует об отсутствии бактерий рода *Salmonella* в анализируемой навеске (объеме) продукта.

Для определения биохимических признаков бактерий рода *Salmonella* допускается использование наборов тест-систем промышленного производства. Эти наборы используют в соответствии с инструкцией изготовителя.

10.5.3.4 При необходимости дальнейшей идентификации ее проводят по ГОСТ 31659.

10.5.4 Обработка результатов

Результаты оценивают по каждой пробе в отдельности.

К бактериям семейства *Enterobacteriaceae* относят аэробные и факультативно-анаэробные, не образующие спор, грамотрицательные палочки, не обладающие оксидазой.

Если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост бактерий семейства *Enterobacteriaceae,* то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к этому семейству.

К бактериям *E.coli* относят оксидазоотрицательные, не образующие спор, грамотрицательные палочки, обладающие способностью ферментации лактозы при температуре (44 ± 1) °С, ферментирующие глюкозу и сорбит, дающие положительную реакцию с метил-рот, образующие индол, не образующие ацетоин и не утилизирующие цитрат. Бактерии, не ферментирующие сорбит и целлобиозу, но по другим биохимическим признакам давшие типичные для *E. coli* реакции, относят к сорбитотрицательным штаммам *E. coli.*

Посевы навески продукта в жидкие среды считают положительными, если при последующем пересеве и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будут обнаружены *E .coli.*

Результаты выявления бактерий рода *Salmonella* в определенной массе или объеме продукта записывают следующим образом: «бактерии рода *Salmonella* обнаружены или не обнаружены в X г (см^3) продукта» (X — масса (объем) продукта, в котором выявляли бактерии рода *Salmonella)*.

10.6 Метод определения общего числа мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

10.6.1 Проведение анализа

Для определения КМАФАнМ из каждой пробы пробиотического препарата (пробиотической кормовой добавки, кормовой добавки микробиологического синтеза, закваски, молочной сыворотки) навеску продукта и (или) его разведения высевают в соответствии с 8.1 с таким расчетом, чтобы на каждой чашке выросло от 30 до 300 колоний.

Для определения общего числа КМАФАнМ в анализируемом пробиотическом препарате (пробиотической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке) анализируемую пробу или его соответствующее разведение вносят в две параллельные стерильные чашки Петри, после чего в каждую чашку вливают тонкий слой расплавленного, остуженного до температуры (45 ± 1) °С питательного агара, приготовленного по 7.4.17. Для предотвращения роста на поверхности агара спорообразующих бактерий и бактерий рода *Proteus* в *Н*-форме рекомендуется наслоить расплавленный и охлажденный агар в количестве 1/3 объема первоначально внесенной в чашку среды. В результате образуется слой толщиной 3—4 мм.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, окончательный учет проводят через 48 ч.

10.6.2 Обработка результатов

При определении общего количества КМАФАнМ в 1 г (1 см^3) анализируемого пробиотического препарата (пробиотической кормовой добавки, кормовой добавки микробиологического синтеза, закваски, молочной сыворотки) подсчитанное количество колоний умножают на степень разведения анализируемой пробы по каждой чашке и выводят среднеарифметическое результатов подсчета колоний в двух чашках.

11 Обработка результатов

11.1 Если анализ предполагает качественную оценку и искомые микроорганизмы обнаружены, результат выражают следующим образом: «Обнаружен», при этом указывают род микроорганизмов и разведение анализируемого препарата.

Если искомые микроорганизмы отсутствуют, результат выражают следующим образом: «Не обнаружен», при этом указывают род микроорганизмов и разведение анализируемого препарата.

11.2 Если анализ предполагает количественную оценку и искомые микроорганизмы обнаружены, то количество искомых микроорганизмов X_1, КОЕ/г или КОЕ/см^3, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{NP}{V}, \quad (1)$$

где N — среднее количество колоний, выросших на чашках Петри из одного разведения;

V — объем разведения, использованного для проведения анализа, см^3;

P — степень разведения.

Далее результаты подсчета, полученные по каждому разведению, суммируют, делят на количество разведений и получают конечный результат — количество искомых микроорганизмов в 1 г (см^3) пробиотического лекарственного средства, микробиологической кормовой добавки, кормовой добавки микробиологического синтеза, закваски или молочной сыворотки.

11.3 Посевы из жидких пробиотических препаратов не должны давать роста посторонней микрофлоры. При обнаружении роста посторонней микрофлоры или грибов определение повторяют на удвоенном количестве проб пробиотического препарата (микробиологической кормовой добавки, кормовой добавки микробиологического синтеза, закваски или молочной сыворотки). Данные повторного определения считают окончательными и распространяют на всю серию (партию).

При обнаружении роста посторонней микрофлоры в повторном определении серию (партию) препарата (пробиотической кормовой добавки, молочной сыворотки) считают не соответствующей требованиям нормативного документа на конкретный препарат (пробиотическую кормовую добавку, кормовую добавку микробиологического синтеза, молочную сыворотку) и бракуют с последующей утилизацией.

11.4 В посевах из пастообразных и твердых (порошкообразных) проб пробиотических препаратов (микробиологических кормовых добавок, кормовых добавок микробиологического синтеза, заквасок) допускается наличие сапрофитной микрофлоры в количестве не более 300 000 КОЕ/г.

Не допускается наличие патогенной микрофлоры (бактерии рода *Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosae, семейства Enterobacteriaceae*).

Библиография

[1] МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности

[2] СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

УДК 619:543.061:543.9:006.354

ОКС 07.100.30
65.120

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, пробиотические лекарственные средства для ветеринарного применения, микробиологические кормовые добавки, кормовые добавки микробиологического синтеза, заквaски, молочные сыворотки, методы определения, методы идентификации, микробиологические методы

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 09.02.2023. Подписано в печать 10.02.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32 Уч.-изд. л. 2,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

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

gost.e-ecolog.ru