СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Н.В. Баковец

«17» 04 2017

УТВЕРЖДАЮ

Управляющий ОДО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский

«___» _____ 2017

Извещение № 1 об изменении
МВИ.МН 4140-2013

Методика выполнения измерений количества дрожжей, плесневых грибов, мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах и при контроле стерильности поверхностей с помощью подложек типа RIDA ® COUNT, производства R-Biopharm AG, Германия

МИНСК 2017

КОПИЯ ВЕРНА

gost.e-ecolog.ru

	ИЛ	ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА		
Дата выпуска		Срок изменения			Лист 2	Листов 2
ПРИЧИНА		Изменение дистрибьютированного названия			КОД	
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ						
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ						
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ						
РАЗОСЛАТЬ						
ПРИЛОЖЕНИЕ		на 18 листах				
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ				
1						

Наименование изложить в новой редакции: «Методика выполнения измерений количества дрожжей, плесневых грибов, мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах и при контроле стерильности поверхностей с помощью подложек типа Sanita-kun, производства JNC Corporation, Япония».

Листы 2-19 заменить.

Ввести лист 20.

КОПИЯ ВЕРНА

Составил				Согласовал			
Проверил				Н.контр.			
Изменение внес							

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения **3**
2 Точность измерений **3**
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы **4**
3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование 4
3.2 Материалы и реактивы 5
4 Метод измерений **5**
4.1 Определение количества дрожжей и плесневых грибов 5
4.2 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов 5
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов **6**
5.1 Требования безопасности 6
5.2 Требования к квалификации персонала 6
6 Условия выполнения измерений **6**
7 Условия хранения подложек Sanita-kun **6**
8 Подготовка к выполнению измерений **6**
8.1 Отбор проб 6
8.2 Подготовка лабораторной посуды 7
8.3 Приготовление растворов 7
8.4 Подготовка проб пищевых продуктов 7
8.5 Взятие смывов с поверхностей 9
8.6 Инкубация подложек 9
9 Выполнение измерений **9**
9.1 Подсчет колоний на подложках 9
9.2 Интерпретация результатов подсчета колоний на подложках 10
9.3 Расчет среднего значения результатов подсчета колоний на подложках 11
10 Обработка результатов измерения **12**
10.1 Расчет окончательного результата измерений 12
10.2 Округление окончательного результата измерений 12
11 Оформление результатов измерений **13**
11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 13
11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки 14
12 Контроль точности результатов измерений **15**
12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости 15
12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости 15
12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 15
12.4 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 16
13 Нормативные ссылки **18**
14 Библиография **19**

КОПИЯ ВЕРНА

1 зам

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на пищевые продукты, смывы с поверхностей при контроле стерильности поверхностей и устанавливает метод определения количества плесневых грибов, дрожжей, количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (далее целевые микроорганизмы).

Методика предназначена для проведения измерений количества целевых микроорганизмов с использованием:

- подложек Sanita-kun Aerobic Count (мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы);
- подложек Sanita-kun Yeast & Mould Rapid (дрожжи, плесневые грибы);

Диапазон измерений составляет:

- При определении мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов: от $3{,}0\times10^{1}$ до $3{,}0\times10^{7}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ* (пищевые продукты, смывы); от 5 до $3{,}0\times10^{1}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3 (ультрапастеризованное, стерилизованное молоко или стерилизованные жидкие молочные смеси).
- При определении дрожжей – от $1{,}5\times10^{1}$ до $1{,}5\times10^{5}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ.
- При определении плесневых грибов – от 5 до $5{,}0\times10^{5}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ.

Предел измерений составляет:

- При определении мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов: $3{,}0\times10^{1}$ КОЕ/см^3, КОЕ (пищевые продукты, смывы); 5 КОЕ/г, КОЕ/см^3 (ультрапастеризованное, стерилизованное молоко или стерилизованные жидкие молочные смеси).
- Дрожжи – $1{,}5\times10^{1}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ.
- Плесневые грибы – 5 КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение количества дрожжей, плесневых грибов, мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в указанных выше диапазонах с показателями точности, приведенными в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели повторяемости и воспроизводимости

Целевые микроорганизмы	Диапазон измерений, КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ	Стандартное отклонение повторяемости σ_r, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ)	Стандартное отклонение воспроизводимости σ_R, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ)
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	от 5 до $3{,}0\times10^{1}$ включ.	0,32 (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$	0,42 (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$
	св. $3{,}0\times10^{1}$ до $3{,}0\times10^{7}$ включ.	0,12	0,19
Дрожжи	от $1{,}5\times10^{1}$ до $1{,}5\times10^{5}$ включ.	0,10	0,[illegible]
Плесневые грибы	от 5 до $5{,}0\times10^{5}$ включ.	0,1[illegible]	[illegible]

*здесь и далее по тексту единицы измерений КОЕ и $\log_{10}$ (КОЕ) используются для смывов

КОПИЯ ВЕРНА

Во всем диапазоне измерений методики смещение незначимо.

Значения оценок расширенной неопределенности приведены в таблице 2.

Указанные в таблицах 1, 2 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2, СТБ ИСО 5725-5;
- показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;
- оценки неопределенности [1].

Таблица 2 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ

Целевые микроорганизмы	Диапазон измерений, КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ	Расширенная неопределенность U, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ), $K = 2, P = 95$ %
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	от 5 до $3{,}0\times10^1$ включ.	0,84 (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$
	св. $3{,}0\times10^1$ до $3{,}0\times10^7$ включ.	0,40*
Дрожжи	от $1{,}5\times10^1$ до $1{,}5\times10^5$ включ.	0,36*
Плесневые грибы	от 5 до $5{,}0\times10^5$ включ.	0,45*

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 1000 г, ценой деления не более 0,1 г.

Лупа измерительная по ГОСТ 25706 с увеличением 5 – 10^x.

Микроскоп световой биологический с увеличением до 900^x по ГОСТ 28489.

Термостат, позволяющий поддерживать температуры 24 °С, 36 °С, 37 °С с погрешностью не более ± 1 °С.

Термометр лабораторный частичного погружения класса точности I с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

pH-метр с диапазоном измерений от 0 pH до14 pH и погрешностью ± 0,1 pH в комплекте с электродами.

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569.

Стерилизатор воздушный по ГОСТ 27437.

Гомогенизатор лабораторный типа Stomacher.

Облучатель бактерицидный, обеспечивающий облученность не менее 0,25 Вт/м^2.

Холодильник бытовой, поддерживающий температуру от +2 °С до + 8 °С.

Пипетки класса точности 2, исполнения 1, вместимостью 1 см^3, 5 см^3, 10 см^3 по ГОСТ 29227 или дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников с объемом дозирования 1000 мм^3, 5000 мм^3, 10000 мм^3 и относительной погрешностью дозирования не более 1,5 %

---

* оценки неопределенности приведены при $\overline{C} = C_{min}$, где $\overline{C}$ – среднее значение результата измерений (см. п. 9.2); C_{min} – минимально определяемое количество колоний (см.п. 9.3). Оценивание неопределенности для значений $\overline{C}$, отличных от указанных в таблице 2, производится согласно п. 11.1.

Цилиндры мерные типа 3–1000–2 по ГОСТ 1770.

Колбы мерные типа 2–100–2 по ГОСТ 1770.

Стаканы типа Н-2-1000 или колбы конические типа Кн–2–1000–45/40 ТС по ГОСТ 25336.

Пробирки бактериологические по ГОСТ 25336.

3.2 Материалы и реактивы

Стерильные пакеты для гомогенизатора лабораторного типа Stomacher.

Спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.

Стерильные ватные тампоны на металлических стержнях или одноразовые стерильные аппликаторы ватные.

Подложки Sanita-kun Aerobic Count, производства JNC Corporation, Япония.

Подложки Sanita-kun Yeast & Mould Rapid, производства JNC Corporation, Япония.

Натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233.

Кислота соляная ч.д.а. по ГОСТ 3118.

Гидроокись калия ч.д.а. по ГОСТ 24363.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Могут быть использованы оборудование по метрологическим и техническим характеристикам и материалы (за исключением подложек Sanita-kun) по качеству не хуже указанных выше.

4 Метод измерений

4.1 Определение количества дрожжей и плесневых грибов

Метод определения количества дрожжей и плесневых грибов основан на посеве определенной навески (аликвоты) образца или его разведения на подложки Sanita-kun Yeast & Mould Rapid, содержащие стандартный набор питательных веществ и хромогенный субстрат. После инкубации посевов, производится определение принадлежности выделенных микроорганизмов к плесневым грибам и дрожжам по результатам микроскопического исследования. Результат измерений получают путем подсчета всех выросших на подложке колоний плесневых грибов или дрожжей.

4.2 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов основан на посеве определенной навески (аликвоты) образца или его разведения на подложки Sanita-kun Aerobic Count, содержащие стандартный набор питательных веществ и хромогенный субстрат. Восстановление хромогена в точках роста бактерий приводит к окрашиванию образующихся колоний в красный цвет, что позволяет производить их подсчет. Результат измерений получают путем подсчета всех выросших на подложке колоний.

ВОЗЬМИТЕ ВЕРНА

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Требования безопасности

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами в соответствии с [2];
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при выполнении работ по данной методике.

Параметры микроклимата на рабочих местах должны соответствовать требованиям [3].

Все использованные после анализа подложки Sanita-kun и другие загрязненные материалы необходимо продезинфицировать в соответствии с [2], СТБ ISO 7218.

5.2 Требования к квалификации персонала

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение по выявлению микроорганизмов с использованием подложек Sanita-kun, изучившие правила безопасной работы в микробиологических лабораториях, настоящую методику и допущенные к работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С.

7 Условия хранения подложек Sanita-kun

Хранение подложек Sanita-kun в невскрытом оригинальном пакете осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение срока хранения, указанного на упаковке. Не допускается замораживать подложки *Sanita-kun. Неиспользованные подложки Sanita-kun хранят в закрытом при* помощи скрепки оригинальном пакете в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 30 дней.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 26668, а также в соответствии с ТНПА на конкретные виды анализируемой продукции. Отбор проб при контроле стерильности поверхностей методом смывов осуществляется в соответствии с п.

КОПИЯ ВЕРНА

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Подготовку лабораторной посуды проводят в соответствии с СТБ ISO 7218.

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Приготовление стерильного физиологического раствора

Навеску 8,5 г хлористого натрия, взвешенную с погрешностью 0,1 г, помещают в коническую колбу или стакан вместимостью 1000 $см^3$ и растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, отмеренной цилиндром. Раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С в течение 20 мин. Хранят раствор при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в герметично закрытой посуде из химически стойкого стекла не более тридцати суток.

8.3.2 Приготовление 1 н раствора гидроокиси калия

Навеску гидроокиси калия массой 5,6 г, взвешенную с погрешностью 0,1 г, вносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют дистиллированную воду в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно на половину своей вместимости. После растворения гидроокиси калия, раствор доводят до метки дистиллированной водой. Раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С в течение 20 мин. Хранят Раствор при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в герметично закрытой полиэтиленовой или фторопластовой посуде не более тридцати суток.

8.3.3 Приготовление 1 н раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ наливают 50 – 70 $см^3$ дистиллированной воды, затем добавляют отмеренные пипеткой 8,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 $г/см^3$. После перемешивания раствора доводят объем до метки дистиллированной водой. При использовании кислоты другой плотности ее объем необходимо пересчитывать. Раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С в течение 20 мин. Хранят раствор при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в герметично закрытой посуде из химически стойкого стекла не более тридцати суток.

8.4 Подготовка проб пищевых продуктов

8.4.1 Подготовка и отбор навесок

Подготовку проб и отбор навесок производят в соответствии с ГОСТ 26669 и *ТНПА на конкретные виды анализируемых образцов с учетом изложенных далее* условий.

Замороженные продукты перед взятием навески размораживают при температуре (4 ± 2) °С. Навеску размороженного продукта отбирают непосредственно после размораживания.

Вскрытие упаковки производят в условиях, исключающих загрязнение продукта микроорганизмами, в непосредственной близости от пламени горелки стерильными инструментами.

Упаковки с ультрапастеризованным, стерилизованным молоком или стерилизованной жидкой молочной смесью выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут. По истечении срока термостатной выдержки потребительскую тару с продуктом охлаждают до (20 ± 5) °С и производят внешний

КОПИЯ ВЕРНА

осмотр. Дальнейшему испытанию подвергают упаковки без видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и др.).

Жидкие образцы перемешивают, твердые гомогенизируют в асептических условиях, исключая возможность контаминации.

Перед отбором навесок проверяют величину pH жидкого образца с помощью pH-метра. Если при проверке pH не находится в диапазоне от 6,6 до 7,2, то pH регулируют путем добавления по каплям 1 н стерильного раствора гидроокиси калия или соляной кислоты, приготовленного по п. 8.3.2 или п. 8.3.3 соответственно.

Навеску для посева отбирают весовым или объемным методом непосредственно после вскрытия пробы продукта.

Масса (объем) навески, предназначенной для посева и/или приготовления разведений, должна быть установлена в нормативно-технической документации на конкретный вид продукции или методы анализа. Масса (объем) навески должна составлять не менее 10,0 ± 0,1 г ($см^3$).

Навеску продукта отбирают так, чтобы в ней были представлены все его компоненты с учетом их соотношения в анализируемой пробе.

8.4.2 Приготовление разведений

Приготовление разведений производят в соответствии с ГОСТ 26669 и ТНПА на конкретные виды анализируемых образцов с учетом изложенных далее условий.

Степень разведения выбирается на основании информации об установленных в ТНПА нормах на количество целевых микроорганизмов для анализируемых продуктов.

После приготовления первого разведения твердого образца проверяют величину pH с помощью pH-метра. Если при проверке pH не находится в диапазоне от 6,6 до 7,2, то pH регулируют путем добавления по каплям 1 н стерильного раствора гидроокиси калия или соляной кислоты, приготовленного по п. 8.3.2 или п. 8.3.3 соответственно.

Для приготовления исходного разведения и последующих разведений используется стерильный физиологический раствор, приготовленный по п. 8.3.1.

Соотношение между массой (объемом) высеваемого образца или его разведения и стерильным физиологическим раствором составляет 1:9.

Продукты жидкой консистенции могут быть использованы для проведения анализа согласно п. 8.4.3 без их разведения.

8.4.3 Проведение микробиологических испытаний пищевых продуктов

Перед использованием подложки Sanita-kun Aerobic Count и Sanita-kun Yeast & Mould Rapid выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 20 мин.

Подложки Sanita-kun Aerobic Count, Sanita-kun Yeast & Mould Rapid помещают на ровную поверхность. Полностью или частично снимают прозрачную пленку подложки.

1,0 $см^3$ продукта, подготовленного по п. 8.4.1, и/или его разведения, приготовленного по п. 8.4.2, пипеткой или дозатором вносят в центр подложки, после чего опускают прозрачную пленку на образец, не допуская образования пузырьков воздуха. Затем пленку прижимают по периметру подложки, избегая контакта с ее центральной частью.

Если для проведения испытаний используют подготовленные по п. 8.4.1 образцы ультрапастеризованного, стерилизованного молока или стерилизованной жидкой молочной смеси, то посев производят на три подложки, получая один

параллельных посева. В остальных случаях посев производят на две подложки, получая два параллельных посева из одного образца и/или его разведения.

8.5 Взятие смывов с поверхностей

В пробирку пипеткой или дозатором вносят 10 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Стерильный тампон помещают в пробирку таким образом, чтобы он не касался жидкости. Перед взятием смыва тампон погружают в раствор. Выполняют протирку поверхности тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, в соответствии с ТНПА по санитарно-гигиеническому контролю. После протирки поверхности тампон переносят в исходную пробирку со стерильным физиологическим раствором, после чего встряхивают пробирку. Снимают пленку с двух подложек и вносят пипеткой или дозатором по 1 $см^3$ полученного раствора в центр каждой подложки, получая два параллельных посева из одного смыва. При оценке результатов измерений в соответствии с п. 10 для данного метода подготовки смывов следует учитывать фактическое разведение 1:10.

8.6 Инкубация подложек

Подложки Sanita-kun Aerobic Count, подготовленные по п. 8.4.3, 8.5 инкубируют в термостате в течение 24 ± 3 ч при температуре 36 ± 1 °С. Подложки Sanita-kun Yeast & Mould Rapid, подготовленные по п. 8.4.3, 8.5 инкубируют в термостате в течение 72 ± 3 ч при температуре 24 ± 1 °С.

В термостате подложки располагают в горизонтальном положении прозрачной пленкой вверх. Допускается размещать подложки друг на друга (до 30 шт.).

9 Выполнение измерений

9.1 Подсчет колоний на подложках

После инкубации подложек Sanita-kun Aerobic Count согласно п. 8.6 подсчитывают все красные колонии, независимо от их размера и интенсивности окраски, получая количество колоний *С* на подложке.

После инкубации подложек Sanita-kun Yeast & Mould Rapid согласно п. 8.6 подсчитывают все колонии дрожжей и плесеней, получая количество колоний *С* на подложке.

При подсчете колоний дрожжей и плесеней руководствуются следующими признаками:

- колонии дрожжей на подложках голубые либо синие, круглой либо овальной формы с четким краем;
- колонии плесневых грибов опушенные, более диффузные, чем колонии дрожжей, большего размера, голубые, красно-фиолетовые, синие либо голубые с красно-фиолетовым центром.

При невозможности однозначной визуальной идентификации колоний дрожжей и плесневых грибов для дополнительного подтверждения проводят микроскопическое исследование. Для выполнения микроскопического исследования поднимают верхнюю пленку подложки, затем пористую салфетку и вынимают колонию из геля. Из колонии готовят препарат методом раздавленной капли. Результаты микрокопирования оценивают, пользуясь характеристикой дрожжей и плесневых грибов, приведенной в таблице 3.

1 зам.

КОПИЯ ВЕРНА

Таблица 3 – Характеристика дрожжей и плесневых грибов

Группа микроорганизмов	Характеристика
Дрожжи	Одноклеточные микроорганизмы, клетки круглой, овальной или продолговатой формы, длиной от 2,5 до 30 мкм и шириной от 2,5 до 10 мкм, часто почкующиеся
Плесневые грибы	Состоят из нитей-гифов, без перегородок или септированных на клетки. Гифы образуют боковые выросты и разветвления, от вегетативных гифов поднимаются гифы, несущие плодовые тела

Для каждого параллельного посева производят интерпретацию результатов подсчета количества микроорганизмов описанным в п. 9.2 способом.

9.2 Интерпретация результатов подсчета колоний на подложках

9.2.1 Интерпретация результатов подсчета колоний двух параллельных посевов

9.2.1.1 Если количество колоний C для каждого параллельного посева удовлетворяет условию

$$C_{min} \le C \le C_{max}, \quad (1)$$

то полученный результат подсчета используют для дальнейшей обработки согласно п. 9.3. Минимально и максимально определяемое количество колоний C_{min}, C_{max} приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Значения C_{min} и C_{max}

Группа микроорганизмов	C_{min}	C_{max}
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	30	300
Дрожжи	15	150
Плесневые грибы	5	50

9.2.1.2 Если отсутствуют подложки с посевами анализируемого образца и/или его разведений, для которых выполняется условие (1), и на подложке выросло более C_{max} колоний, то подсчитывают количество колоний в трех показательных квадратах подложек максимального разведения, получая соответствующие значения C_I, C_{II}, C_{III}. Проверяют выполнение условия (2)

$$C_I + C_{II} + C_{III} \le C_{max} \quad (2)$$

- При выполнении условия (2) количество колоний C на подложке рассчитывают по следующей формуле

$$C = 20 \cdot \frac{C_I + C_{II} + C_{III}}{3}, \quad (3)$$

- При невыполнении условия (2) повторяют подготовку проб или взятие смывов в соответствии с п. 8.4, 8.5, используя для посева разведения более высокой степени.

9.2.1.3 Если количество колоний в обоих параллельных [illegible] двух

последовательных разведений соответствует условию (1), оценку проводят по результатам посева наибольшего разведения.

9.2.1.4 Если в одном из параллельных посевов одного разведения число колоний не соответствует условию (1), а среднее значение двух параллельных посевов соответствует этому условию, и отсутствуют параллельные посевы других разведений, удовлетворяющие условию (1), то эти результаты используют для дальнейшей обработки согласно п. 9.3.

9.2.1.5 Если отсутствуют подложки с посевами минимального разведения анализируемого образца, для которых выполняется условие (1), и на каждой из двух подложек параллельных посевов минимального разведения или жидкого образца количество подсчитанных колоний менее C_{min}, то проводят одностороннюю оценку результата измерения в соответствии с п. 11.2.1.

9.2.2 Интерпретация результатов подсчета колоний трех параллельных посевов

9.2.2.1 Если количество колоний C для каждого параллельного посева удовлетворяет условию (1), то полученный результат подсчета используют для дальнейшей обработки согласно п. 9.3.

9.2.2.2 Если количество колоний в параллельных посевах образца и его разведения соответствует условию (1), оценку проводят по результатам посева этого разведения.

9.2.2.3 Если в одном из параллельных посевов число колоний не соответствует условию (1), а среднее значение параллельных посевов соответствует этому условию, и отсутствуют параллельные посевы разведений, удовлетворяющие условию (1), то эти результаты используют для дальнейшей обработки согласно п. 9.3.

9.2.2.4 Если количество колоний в параллельных посевах образца соответствует условию (4), то полученный результат подсчета используют для дальнейшей обработки согласно п. 9.3.

$$C_1 + C_2 + C_3 \geq 0,5C_{min}, \quad (4)$$

где C_1, C_2, C_3 – количество колоний в трех параллельных посевах, КОЕ;

C_{min} – минимально определяемое количество колоний, приведенное в таблице 4.

9.2.2.5 Если отсутствуют подложки с посевами анализируемого образца, для которых выполняется условие (1), и на подложке выросло более C_{max} колоний, то проводят интерпретацию результатов подсчета согласно п. 9.2.1.2.

9.2.2.6 Если сумма количества колоний в трех параллельных посевах образца меньше C_{min}, то проводят одностороннюю оценку результата измерения в соответствии с п. 11.2.1.

9.3 Расчет среднего значения результатов подсчета колоний на подложках

Среднее значение результатов подсчета колоний $\overline{C}$, КОЕ, на подложках параллельных посевов, выбранных согласно пп. 9.1, 9.2 для обработки, рассчитывается по формуле

$$\overline{C} = \frac{\sum_{i=1}^{n_C} C_i}{n_C}, \quad (5)$$

где C_i – количество колоний на подложке i-го параллельного посева;

КОПИЯ ВЕРНА

n_C – количество параллельных посевов.

Среднее значение результатов подсчета колоний используется для расчета окончательного результата измерений количества целевых микроорганизмов согласно п. 10.

10 Обработка результатов измерения

10.1 Расчет окончательного результата измерений

Результат единичного измерения количества микроорганизмов M, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ (для смывов), рассчитывают по формуле

$$M = N \cdot \overline{C}, \quad (6)$$

где $\overline{C}$ – среднее количество колоний на подложках параллельных посевов, полученное в соответствии с п. 9.3;

N – степень разведения, составляющая для разведения 1:10 –10, для разведения 1:100 – 100 и т.п.

За окончательный результат измерений количества целевых микроорганизмов $\overline{M}$, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ (для смывов), принимают результат единичного количества микроорганизмов M, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ (для смывов), рассчитываемый по формуле (6), при условии, что при проведении измерений выполняется контроль повторяемости в соответствии с п. 12.2 с периодичностью, установленной системой менеджмента качества лаборатории.

При выполнении двух параллельных измерений проб образца (анализ проводится с использованием двух навесок) за окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 12.2, рассчитываемое по формуле

$$\overline{M} = \frac{M_1 + M_2}{2}, \quad (7)$$

где M_1, M_2 – результаты параллельных измерений количества целевых микроорганизмов, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ (для смывов), рассчитываемые по формуле (6).

Если окончательный результат измерений количества целевых микроорганизмов превышает значение, соответствующее верхней границе диапазона измерений, приведенное в таблице 1, то проводят одностороннюю оценку результата измерения в соответствии с п. 11.2.3.

10.2 Округление окончательного результата измерений

10.2.1 Если окончательный результат измерений $\overline{M}$, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ соответствует условию

$$\overline{M} < 10, \quad (8)$$

то он выражается в виде целого числа.

10.2.2 Если условие (8) не выполняется, то окончательный результат измерений $\overline{M}$, КОЕ/г (КОЕ/см^3) или КОЕ (для смывов), выражается числом в научной нотации вида

$$\overline{M} = d \times 10^n, \quad (9)$$

где d – мантисса, соответствующая условию

$$1{,}0 \le d \le 9{,}9, \quad (10)$$

КОПИЯ ВЕРНА

n – экспонента.

При расчете окончательного результата мантисса d округляется до десятых, причем, 5 в сотых округляется до четного числа в десятых.

10.2.3 Для смывов проводится дальнейшая обработка полученного результата измерений в соответствии с конкретным ТНПА по санитарно-гигиеническому контролю, например [4].

11 Оформление результатов измерений

11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Если результат измерений при определении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов находится в диапазоне от 5 до $3{,}0\times10^{1}$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, то он может быть представлен в виде*

$$\overline{M}, \text{КОЕ/г}\left[\overline{M}+U^2-2\cdot U\cdot\sqrt{\overline{M}}\,,\overline{M}+U^2+2\cdot U\cdot\sqrt{\overline{M}}\right]$$

$$\overline{M}, \text{КОЕ/см}^3\left[\overline{M}+U^2-2\cdot U\cdot\sqrt{\overline{M}}\,,\overline{M}+U^2+2\cdot U\cdot\sqrt{\overline{M}}\right]$$

при доверительной вероятности P = 0,95, K=2

где $\overline{M}$ – результат измерений, КОЕ/г (КОЕ/см^3), полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 10;

U – расширенная неопределенность результатов измерений, $(\text{КОЕ/г})^{1/2}$, $(\text{КОЕ/см}^3)^{1/2}$, U =0,84 $(\text{КОЕ/г})^{1/2}$, $(\text{КОЕ/см}^3)^{1/2}$.

В остальных случаях результат измерений может быть представлен в виде

$$\overline{M}, \text{КОЕ/г}\left[10^{\lg\overline{M}-U}, 10^{\lg\overline{M}+U}\right]$$

$$\overline{M}, \text{КОЕ/см}^3\left[10^{\lg\overline{M}-U}, 10^{\lg\overline{M}+U}\right]$$

$$\overline{M}, \text{КОЕ}\left[10^{\lg\overline{M}-U}, 10^{\lg\overline{M}+U}\right] \text{ (для смывов)}$$

при доверительной вероятности P = 0,95, K=2

где $\overline{M}$ – результат измерений, КОЕ/г (КОЕ/см^3), полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 10;

U – расширенная неопределенность результатов измерений, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ).

В таблице 2 приведены оценки расширенной неопределенности результатов измерений, для которых выполняется условие (11)

$$\overline{C} = C_{\min}, \qquad (11)$$

где $\overline{C}$ – среднее значение результатов подсчета колоний, КОЕ, определяется согласно п. 9.2;

$C_{\min}$ – минимально определяемое количество колоний, КОЕ, приведенное в п. 9.3.

Для других значений оценка расширенной неопределенности измерений рассчитывается по формуле



* применимо для результатов измерений образцов ультрапастеризованного, стерилизованного молока или стерилизованной жидкой молочной смеси

$$U = 2 \cdot \sqrt{\sigma_R^2 + \frac{0{,}18861}{2 \cdot \overline{C}}}, \qquad (12)$$

где σ_R – стандартное отклонение воспроизводимости, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ), приведенное в таблице 1.

При необходимости может быть использована оценка расширенной неопределенности измерений, полученная в соответствии с [1] для конкретного вида пищевого продукта или смыва.

11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки

11.2.1 Если среднее значение результатов подсчета колоний целевых микроорганизмов $\overline{C}$ на двух подложках параллельных посевов минимального разведения или жидкого образца окажется менее минимально определяемого количества колоний C_{min}, приведенного в таблице 4, то дают одностороннюю оценку результата измерения вида

менее M_{min},

где M_{min} рассчитывают по формуле (13)

$$M_{min} = C_{min} \cdot N_{min}, \qquad (13)$$

где N_{min} – степень разведения для минимального разведения, при посеве жидкого образца N_{min}=1.

M_{min} выражают согласно п. 10.2.

11.2.2 Если сумма количества колоний целевых микроорганизмов на трех подложках параллельных посевов образца окажется менее 15 КОЕ, то дают одностороннюю оценку результата измерения вида

менее M_{min},

где M_{min}=5 КОЕ/г (КОЕ/см^3).

11.2.3 Если окончательный результат измерений количества целевых микроорганизмов превышает значение, соответствующее верхней границе диапазона измерений, приведенное в таблице 1, то дают одностороннюю оценку результата измерения вида

более M_{max},

где M_{max} – количество целевых микроорганизмов, соответствующее верхней границе диапазона измерений, и составляющее:

- для мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – $3{,}0 \times 10^7$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ;
- для дрожжей –$1{,}5 \times 10^5$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ;
- для плесневых грибов –$5{,}0 \times 10^5$ КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ.

12 Контроль точности результатов измерений

Контроль точности проведения измерений выполняется с периодичностью,



* применимо для результатов измерений образцов ультрапастеризованного, стерилизованного молока или стерилизованной жидкой молочной смеси

установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят следующим образом. Рассчитывают расхождение для результатов параллельных измерений M_1, M_2 проб одного образца или смыва следующим образом.

Если при определении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов величина $\overline{M}$, рассчитанная по формуле (7), удовлетворяет условию

$$\overline{M} < 30, \tag{14}$$

то расхождение D_r рассчитывают по следующей формуле

$$D_r = \left|\sqrt{M_1} - \sqrt{M_2}\right| \tag{15}$$

Во всех остальных случаях расхождение D_r рассчитывают по формуле

$$D_r = \left|\lg M_1 - \lg M_2\right| \tag{16}$$

Значение D_r сравнивают со значением предела повторяемости r. Если выполняется условие

$$D_r \le r, \tag{17}$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве окончательного результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{M}$, рассчитанное по формуле (7).

Значение предела повторяемости r, выраженное в $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ), или (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$ приведено в таблице 5.

При невыполнении условия (17) проводят повторный анализ проб или смывов согласно разделов 8, 9.

12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят следующим образом.

Каждая из двух лабораторий получает по 2 единичных измерения одного образца согласно разделу 9, обеспечивая контроль повторяемости по п. 12.2, и рассчитывает окончательный результат измерений согласно п. 10.

КОПИЯ ВЕРНА

Расхождение D_R для окончательных результатов измерений $\overline{M}_1, \overline{M}_2$ полученных в двух лабораториях, рассчитывают по формулам (15), (16) аналогично D_r, и сравнивают со значением критической разности CD. Если выполняется условие

$$D_R \le CD, \tag{18}$$

то оба окончательных результата измерений, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{M}}$, рассчитанное по формуле

$$\overline{\overline{M}} = \frac{\overline{M}_1 + \overline{M}_2}{2}, \tag{19}$$

может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Значение критической разности CD, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ), или (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$, рассчитывают по формуле

$$CD = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \tag{20}$$

где r – значение предела повторяемости, указанное в таблице 5, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ) или (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$;

R – значение предела воспроизводимости, указанное в таблице 5, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ) или (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6.

Таблица 5 – Значения предела повторяемости и воспроизводимости

Целевые микроорганизмы	Диапазон измерений, КОЕ/г, КОЕ/см^3, КОЕ	Предел повторяемости r, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ)	Предел воспроизводимости R, $\log_{10}$ (КОЕ/г), $\log_{10}$ (КОЕ/см^3), $\log_{10}$ (КОЕ)
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	от 5 до $3{,}0\times10^1$ включ.	0,90 (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$	1,18 (КОЕ/г)$^{1/2}$, (КОЕ/см^3)$^{1/2}$
	св. $3{,}0\times10^1$ до $3{,}0\times10^7$ включ.	0,34	0,53
Дрожжи	от $1{,}5\times10^1$ до $1{,}5\times10^5$ включ.	0,28	0,45
Плесневые грибы	от 5 до $5{,}0\times10^5$ включ.	0,31	0,50

12.4 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

Для контроля стабильности результатов измерений строят контрольную карту индивидуальных значений*.

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [5], раздел 6.

* процедура контроля стабильности результатов измерений с помощью контрольных карт Шухарта используется при определении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в диапазоне от 5 до $3{,}0\times10^1$ КОЕ/г, КОЕ/см^3

12.4.1 Образцы для контроля, применяемые при ведении контрольных карт

Для построения и ведения контрольных карт используются образцы для контроля (далее ОК), представляющие собой стандартные образцы или рабочие образцы с естественной контаминацией, а также коммерчески доступные образцы для контроля качества. ОК должны быть стабильны по определяемым показателям в течение времени ведения КК. Количество целевых микроорганизмов в ОК должно находиться в диапазоне измерений МВИ.

При использовании в качестве ОК рабочих образцов обеспечивают достаточную однородность подготовленных для ведения контрольной карты проб, перемешивая или гомогенизируя исходный образец. Образец разделяют на пробы, количество каждой пробы должно быть достаточно для проведения анализа с получением единичного результата измерения. Пробы помещают в стерильную упаковку и хранят при условиях, обеспечивающих стабильность по определяемым показателям в течение времени ведения контрольной карты.

Стандартные образцы или коммерчески доступные образцы для контроля качества используют в соответствии с рекомендациями производителя.

12.4.2 Набор начальных данных, необходимых для построения контрольных карт

Для построения контрольных карт необходимо получить в соответствии с данной МВИ результаты единичных измерений проб ОК, подготовленных по п. 12.4.1 в течение минимального промежутка времени. Набор данных должен производиться при варьировании таких факторов, как например, время, оператор, реактивы, материалы, оборудование, которые будут изменяться в ходе ведения контрольных карт. Количество результатов измерений должно быть от 20 до 30.

12.4.3 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация карт индивидуальных значений

По результатам измерений, полученным в соответствии с п. 12.4.2 рассчитывают значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$CL = \frac{\sum_{i=1}^{N} \lg M_i}{N} \qquad (21)$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;

M_i – количество микроорганизмов, полученное в ходе i–го измерения, КОЕ/г (КОЕ/см^3), КОЕ;

- Предупреждающие границы

$$UCL = CL + 2 \cdot S \qquad LCL = CL - 2 \cdot S \ , \qquad (22)$$

- Границы регулирования

$$UCL = CL + 3 \cdot S \qquad LCL = CL - 3 \cdot S \qquad (23)$$

где S – стандартное отклонение, $\log_{10}$(КОЕ/г), $\log_{10}$(КОЕ/см^3), ($\log_{10}$(КОЕ), рассчитываемое по формуле

КОПИЯ ВЕРНА

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{N}(CL - \lg M_i)^2}{N-1} \qquad (24)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений M_i при выполнении анализа ОК в соответствии с МВИ, оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], п. 7.

13 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–99	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336–82 Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 29245-91	Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей.
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике
ГОСТ 3118-77	Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328-77	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
СТБ ISO 7218-2010	Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований
ГОСТ 24363-80	Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 25706-83	Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования
ГОСТ 26668-85	Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26669-85	Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов
ГОСТ 26670-91	Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.
ГОСТ 28489-90	Микроскопы световые. Термины и определения
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 9284-75	Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 6672-75	Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

КОПИЯ ВЕРНА

Библиография

[1]	ISO/TS 19036:2006 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерения для количественных определений *Перевод с английского*
[2]	СП 17-129 РБ 2000 Безопасность при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами
[3]	Санитарные Правил и Нормы 9-80-98 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 25 марта 1999г. № 12 и ГОСТ 12.1.005-88
[4]	Инструкция № 078-0210 «Санитарно-бактериологический контроль на объектах общественного питания и предприятиях продовольственной торговли», утвержденная Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 12 марта 2010 г.
[5]	ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта

КОПИЯ ВЕРНА

gost.e-ecolog.ru