МКС 07.100.30

к СТБ ISO 21528-1-2009 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальные методы обнаружения и подсчета бактерий семейства Enterobacteriaceae. Часть 1. Обнаружение и подсчет методом MPN с предварительным обогащением

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Пункт 3	ISO 21528:2004	ISO 21528-1:2004

(ИУ ТНПА № 2-2010)

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 21528-1-2009

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Горизонтальные методы обнаружения и подсчета бактерий семейства Enterobacteriaceae

Часть 1

Обнаружение и подсчет методом MPN с предварительным обогащением

МІКРАБІЯЛОГІЯ ХАРЧОВЫХ ПРАДУКТАЎ І КАРМОЎ ДЛЯ ЖЫВЁЛЫ

Гарызантальныя метады выяўлення і падліку бактэрый сямейства Enterobacteriaceae

Частка 1

Выяўленне і падлік метадам MPN з папярэднім абагачэннем

(ISO 21528-1:2004, IDT)

Издание официальное

БЗ 12-2009



Госстандарт
Минск

УДК 579.672+579.64(083.74)(476) МКС 07.100.30 КП 03 IDT

Ключевые слова: бактерии семейства Enterobacteriaceae, метод обнаружения, вычисление наиболее вероятного числа (MPN)

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 29 декабря 2009 г. № 73

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21528:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальные методы обнаружения и подсчета бактерий семейства Enterobacteriaceae. Часть 1. Обнаружение и подсчет методом MPN с предварительным обогащением).

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

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2010

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Принцип 2
5 Питательные среды и реактивы 3
6 Аппаратура и стеклянная посуда 5
7 Отбор проб 6
8 Приготовление пробы для испытания 6
9 Методика 6
10 Выражение результатов 8
11 Прецизионность 8
12 Протокол испытания 8
Приложение А (обязательное) Схема процедуры для метода обнаружения 9
Приложение В (обязательное) Схема процедуры для метода MPN 10

Введение

Настоящий стандарт предназначен для обеспечения общего руководства при исследовании продуктов, на которые не распространяются существующие международные стандарты, и должен приниматься в расчет организациями, разрабатывающими микробиологические методы испытания пищевых продуктов и кормов. Ввиду большого разнообразия продуктов в данной области применения эти руководящие указания могут не во всех отношениях подходить для определенных продуктов, и в отношении некоторых продуктов может возникнуть необходимость в использовании других методов. Вместе с тем предполагается, что во всех случаях будут предприниматься всевозможные усилия, направленные на применение данных руководящих указаний, и отклонения от них будут отмечаться только в том случае, если они окажутся абсолютно необходимыми по техническим соображениям.

При последующем пересмотре настоящего стандарта будет учтена вся накопленная информация, касающаяся как степени применения данных руководящих указаний, так и причин отклонений от них в случае конкретных продуктов.

Гармонизация методов испытаний не может быть проведена немедленно, и для определенных групп продуктов уже существуют международные стандарты и/или национальные стандарты, которые могут не соответствовать данному горизонтальному методу.Возможно, что при пересмотре этих стандартов они будут изменены в соответствии с настоящим стандартом таким образом, чтобы в конечном счете единственными отклонениями от данного горизонтального метода остались те, которые необходимы по вполне обоснованным техническим причинам.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ
Горизонтальные методы обнаружения и подсчета бактерий семейства Enterobacteriaceae
Часть 1
Обнаружение и подсчет методом MPN с предварительным обогащением

МІКРАБІЯЛОГІЯ ХАРЧОВЫХ ПРАДУКТАЎ І КАРМОЎ ДЛЯ ЖЫВЁЛЫ
Гарызантальныя метады выяўлення і падліку бактэрый сямейства Enterobacteriaceae
Частка 1
Выяўленне і падлік метадам MPN з папярэднім абагачэннем

Microbiology of food and animal feeding stuffs
Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae
Part 1
Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment

Дата введения 2010-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод, с предварительным обогащением, предназначенный для обнаружения бактерий семейства Enterobacteriaceae. Настоящий стандарт распространяется на:

– продукты, предназначенные для потребления человеком, корма для животных;

– пробы окружающей среды в сфере производства и обработки продуктов питания.

Подсчет проводится путем вычисления наиболее вероятного числа (most probable number – MPN после инкубации при температуре 37 °C (или 30 °C) [1)] в жидкой питательной среде.

Данный метод применяют:

– когда предполагается, что перед обогащением рассматриваемым микроорганизмам требуется восстановить жизненно важные функции, и

– когда предполагается, что перед обогащением рассматриваемое количество микроорганизмов лежит в диапазоне от 1 до 100 на миллилитр или на грамм испытываемой пробы.

Применение настоящего стандарта ограничено ввиду подверженности данного метода большой степени изменчивости (см. раздел 11).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

ISO 6887-1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятичных разведений

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

ISO 6887-3:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для подготовки рыбы и рыбных продуктов

[1)] Температура 37 °C обычно используется, когда подсчет Enterobacteriaceae осуществляется для выведения гигиенического индикатора. Альтернативно можно использовать значение 30 °C, когда подсчет этих бактерий проводится для технологических целей и включает психотропные Enterobacteriaceae.

Издание официальное

ISO 6887-4:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для подготовки продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбных продуктов

ISO 7218:2007 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ISO 8261:2001 Молоко и молочные продукты. Общее руководство по подготовке испытательных проб, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологического исследования

ISO/TS 11133-1:2009 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по подготовке и приготовлению питательных сред. Часть 1. Общее руководство по обеспечению качества подготовки питательных сред в лаборатории

ISO/TS 11133-2:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по подготовке и приготовлению питательных сред. Часть 2. Практическое руководство по проверке качества питательных сред

3 Термины и определения

В настоящем стандарте используются следующие термины и определения.

3.1 бактерии семейства Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae): Микроорганизмы, которые образуют характерные колонии на глюкозном агаре с желчью и фиолетовым красным, сбраживают глюкозу и дают отрицательную реакцию на оксидазу, если испытания проводятся в соответствии с методами, установленными в настоящем стандарте.

3.2 обнаружение бактерий семейства Enterobacteriaceae (detection of Enterobacteriaceae): Определение присутствия или отсутствия указанных бактерий в конкретном количестве продукта, когда испытания проводятся в соответствии с настоящим стандартом.

3.3 подсчет Enterobacteriaceae (enumeration of Enterobacteriaceae): Наиболее вероятное количество бактерий семейства Enterobacteriaceae, обнаруженное на миллилитр или на грамм испытываемой пробы при испытании в соответствии с методом, установленным в настоящем стандарте.

4 Принцип

4.1 Обнаружение бактерий семейства Enterobacteriaceae (см. приложение А)

4.1.1 Предварительное обогащение в неселективной среде

Навеску продукта высевают в забуференную пептонную воду (buffered peptone water – BPW) и инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1)] в течение (18 ± 2) ч.

4.1.2 Обогащение в селективной жидкой среде

Культуры, полученные после предварительного обогащения, пересеивают в буферный глюкозный бульон с желчью и бриллиантовым зеленым (бульон ЕЕ) для селективного обогащения и инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1)] в течение (24 ± 2) ч.

4.1.3 Выделение и идентификация культур

На селективную твердую среду (глюкозный агар с желчью и фиолетовым красным) пересевают культуры, полученные после предварительного обогащения в ЕЕ-бульоне и инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1)]. Среду исследуют по истечении (24 ± 2) ч для проверки наличия колоний, характерных для бактерий семейства Enterobacteriaceae.

4.1.4 Подтверждение

Колонии, предположительно относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, пересевают на неселективную (неизбирательную) среду и подтверждают с помощью тестов по ферментации глюкозы и определению наличия оксидазы.

4.2 Подсчет с помощью метода MPN (см. приложение В)

4.2.1 Предварительное обогащение в неселективной среде

Испытываемую навеску продукта *x* г вносят в 9*x* мл BPW и гомогенизируют. В BPW готовят одно или ряд 10-кратных разведений (согласно предполагаемому уровню обсеменения). В три пробирки переносят равные количества (10 мл) данного исходного разведения.

Затем 1 мл исходного разведения вносят в 9 мл BPW в трехкратной повторности и 1 мл каждого последующего разведения вносят в 9 мл BPW в трехкратной повторности. Эти пробирки инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1] в течение (18 ± 2) ч.

4.2.2 Обогащение в селективной жидкой среде

Культуры, полученные после предварительного обогащения (по крайней мере 3 × 3), пересевают в пробирки с жидкой средой для обогащения (ЕЕ-бульон). Пробирки инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1] в течение (24 ± 2) ч.

4.2.3 Выделение и идентификация культур

Культуры, полученные после обогащения в ЕЕ-бульоне, пересевают с помощью петли на неселективную твердую среду (глюкозный агар с желчью и фиолетовым красным). Затем инкубируют при температуре 37 °С (или 30 °С) [1]. Среду исследуют по истечении (24 ± 2) ч для проверки наличия колоний, характерных для бактерий семейства Enterobactriaceae.

4.2.4 Подтверждение

Колонии, предположительно относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, пересевают на селективную среду и подтверждают с помощью тестов по ферментации глюкозы и определению наличия оксидазы.

4.2.5 Расчет

Наиболее вероятное число бактерий семейства Enterobactriaceae на миллилитр или грамм испытываемой пробы вычисляют из числа подтвержденных положительных пробирок, используя таблицу MPN (см. ISO 7218).

5 Питательные среды и реактивы

Относительно применяемых в настоящее время лабораторных практик см. ISO 7218, ISO/TS 11133-1 и ISO/TS 11133-2.

5.1 Жидкость для разведения: забуференная пептонная вода (BPW)

См. ISO 6887-1:1999 (пункт 5.2.2).

Для метода подсчета используют BPW в качестве неселективной среды предварительного обогащения.

5.2 Питательные среды

5.2.1 Среда обогащения: глюкозный бульон с желчью и бриллиантовым зеленым (ЕЕ-бульон)

5.2.1.1 Состав

Продукт ферментативного дигидрирования животных тканей	10,0 г
Глюкоза	5,0 г
Натрий фосфорнокислый (Na_2HPO_4) 2-замещенный	6,45 г
Калий фосфорнокислый (KH_2PO_4) 1-замещенный	2,0 г
Говяжья желчь для бактериологического использования	20,0 г
Бриллиантовый зеленый (бактериологического качества)	0,0135 г
Вода	1 000 мл

5.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или сухую полноценную среду в воде путем кипячения. Нельзя нагревать среду более чем 30 мин. Полученную среду быстро охлаждают.

Устанавливают pH, если это необходимо, так, чтобы после кипячения он составлял 7,2 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Разливают среду в количестве 10 мл в стерильные пробирки соответствующей вместимости (6.5).

Среду не стерилизуют.

Такую среду можно хранить до 1 мес при температуре (5 ± 3) °С.

5.2.1.3 Оценка качества питательной среды

Относительно определения избирательности и продуктивности см. ISO/TS 11133-1. Относительно характеристик среды см. ISO/TS 11133-2:2003 (таблица B.3).

5.2.2 Глюкозный агар с желчью и фиолетовым красным (VRBG)

5.2.2.1 Химический состав

Продукт ферментативного дигидрирования животных тканей	7,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Соли желчи № 3	1,5 г
Глюкоза	10,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,002 г
Агар	9 – 18 г [a)]
Вода	1 000 мл
[a)] В зависимости от прочности агарового геля.	

5.2.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты или сухую полноценную среду в воде путем кипячения.

Устанавливают pH, если это необходимо, так, чтобы после кипячения он составлял 7,4 ± 0,2 при температуре 25 °C.

Разливают питательную среду в стерильные пробирки или колбы (6.5) соответствующей вместимости.

Среду не стерилизуют.

Расплавленную среду можно использовать в течение 4 ч с момента ее приготовления.

5.2.2.3 Приготовление чашек Петри с агаром

Приблизительно 15 мл питательной среды, охлажденной до температуры в диапазоне от 44 °C до 47 °C (6.4), заливают в чашки Петри (6.7) и дают среде застыть.

Непосредственно перед использованием высушивают чашки, предпочтительно при снятых крышках и поверхностью агара, смотрящей вниз, в сушильном шкафу (6.3) до тех пор, пока агар не высохнет.

Невысушенные чашки, приготовленные заранее, можно хранить в условиях, которые не приведут к изменению их химического состава, до 2 нед при температуре (5 ± 3) °C.

5.2.2.4 Оценка качества питательной среды

Относительно определения избирательности и продуктивности см. ISO/TS 11133-1. Относительно характеристик см. ISO/TS 11133-2:2003 (таблица B.1).

5.2.3 Полноценный питательный агар

5.2.3.1 Состав

Экстракт мяса	3,0 г
Продукт ферментативного дигидрирования животных тканей	5,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Агар	9 – 18 г [a)]
Вода	1 000 мл
[a)] В зависимости от прочности агарового геля.	

5.2.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты или сухую полноценную среду в воде путем кипячения, если это необходимо.

Устанавливают pH, если это необходимо, так, чтобы после кипячения он составлял 7,3 ± 0,2 при температуре 25 °C.

Разливают питательную среду в стерильные пробирки или колбы (6.5) соответствующей вместимости.

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

5.2.3.3 Приготовление чашек Петри с агаром

Заливают приблизительно по 15 мл питательной среды, расплавленной и охлажденной до температуры около 47 °C, в чашки Петри (6.7) и дают застыть.

Непосредственно перед использованием высушивают чашки, предпочтительно при снятых крышках и поверхностью агара, смотрящей вниз, в сушильном шкафу (6.3) до тех пор, пока агар не высохнет.

Невысушенные чашки, приготовленные заранее, можно хранить в условиях, которые не приведут к изменению их химического состава, до 2 нед при температуре (5 ± 3) °С.

5.2.3.4 Оценка качества питательной среды

Относительно определения избирательности и продуктивности см. ISO/TS 11133-1. Относительно характеристик см. ISO/TS 11133-2:2003 (таблица B.6).

5.2.4 Глюкозный агар

5.2.4.1 Состав

Продукт ферментативного дигидрирования казеина	10,0 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г
Глюкоза	10,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Бромкрезоловый пурпуровый	0,015 г
Агар	9 – 18 г [a)]
Вода	1 000 мл
[a)] В зависимости от прочности агарового геля.	

5.2.4.2 Приготовление

Растворяют компоненты или сухую полноценную среду в воде путем нагрева, если это необходимо.

Устанавливают pH, если это необходимо, так, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Разливают питательную среду в пробирки (6.6) соответствующей вместимости (например, 10 мл культуральной среды в пробирки размером 16 × 160 мм).

Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин. Пробирки оставляют в вертикальном положении.

Полученную среду можно хранить до 1 нед при температуре (5 ± 3) °С.

Для удаления кислорода непосредственно перед использованием нагревают среду в кипящей воде или потоке пара в течение 15 мин, затем быстро охлаждают до инкубационной температуры.

5.3 Реактив для определения оксидазы

5.3.1 Химический состав

N,*N*,*N'*,*N'*-тетраметил-пара-фенилендиамин дигидрохлорид	1,0 г
Вода	100 мл

5.3.2 Приготовление

Растворяют компонент в холодной воде.

Готовят реактив непосредственно перед использованием.

Можно использовать имеющиеся в продаже диски или палочки. В этом случае следуют рекомендациям изготовителя.

6 Аппаратура и стеклянная посуда

Обычная аппаратура микробиологической лаборатории, и в частности следующая (см. ISO 7218).

6.1 Аппарат для сухой стерилизации (сухожаровой шкаф) или **паровой стерилизации** (автоклав). См. ISO 7218.

6.2 Термостат, способный функционировать при температуре (37 ± 1) °С.

6.3 Сушильный шкаф (вентилируемый путем конвекции) или **термостат**, способный функционировать в диапазоне от 37 °С до 55 °С.

6.4 Водяная баня или аналогичное устройство, способное поддерживать температуру от 44 °С до 47 °С.

6.5 Лабораторная посуда (например, бутылки, пробирки, колбы), пригодная для стерилизации и хранения питательных сред.

6.6 Пробирки, имеющие размеры 16 × 160 мм и 20 × 200 мм, и колбы или бутылки вместимостью от 150 до 500 мл.

6.7 Чашки Петри, изготовленные из стекла или пластика, диаметром от 90 до 100 мм.

6.8 Петли (диаметром приблизительно 3 мм) и **проволоки**, изготовленные из платины/иридия или никеля/хрома, или **стеклянные палочки**, или эквивалентные стерильные разовые петли или иглы для посева.

6.9 Градуированные пипетки номинальной вместимостью 1 мл, градуированные, с ценой деления 0,1 мл и выходным отверстием соответствующего диаметра.

6.10 pH-метр, способный считывать с точностью до ±0,1 единицы pH при температуре 25 °C.

6.11 Гомогенизатор

См. ISO 7218.

7 Отбор проб

Важно, чтобы лаборатория получила пробу, которая является действительно представительной и не потерпела повреждений и изменений в ходе транспортировки или при хранении.

Отбор проб должен проводиться в соответствии с определенным международным стандартом, распространяющимся на данную продукцию. В случае отсутствия определенного международного стандарта данный вопрос рекомендуется согласовывать заинтересованным сторонам.

8 Приготовление пробы для испытания

Приготавливают пробу согласно ISO 6887-1, ISO 6887-2, ISO 6878-3, ISO 6887-4, ISO 8261 и/или конкретному международному стандарту на данную продукцию. В случае отсутствия определенного международного стандарта данный вопрос рекомендуется согласовывать заинтересованным сторонам.

9 Методика

9.1 Общие положения

См. ISO 7218.

Питательные среды обычно инкубируют при температуре 37 °C. Альтернативно можно использовать температуру инкубации 30 °C [1)].

9.2 Метод обнаружения

9.2.1 Навеска продукта для испытания и исходное разведение

Навеску продукта для испытания (*x* г или *x* мл), согласно требуемой чувствительности, высевают в 9*x* мл BPW (5.1). Переносят соответствующий объем в стерильную пробирку или другую лабораторную посуду (6.5) в соответствии с пределом требуемого обнаружения.

9.2.2 Неселективное предварительное обогащение

Посевы инкубируют (9.2.1) при температуре 37 °C в течение (18 ± 2) ч.

9.2.3 Селективное обогащение

Переносят 1 мл культуры, полученной после инкубирования по 9.2.2, в пробирку, содержащую 10 мл среды для селективного обогащения (5.2.1).

Инкубируют посевы при температуре 37 °C в течение (24 ± 2) ч.

Далее продолжают методику путем выделения и идентификации культур (9.4).

9.3 Метод подсчета (метод MPN)

9.3.1 Навеска продукта, исходное и последующие разведения

В зависимости от требуемой точности результатов засевают соответствующее количество колб или пробирок одним и тем же разведением (например, три, пять или десять колб или пробирок). Как правило, установленные методы требуют три колбы или пробирки на одно разведение.

Для приготовления исходного и последующих разведений используют жидкость для разведения (5.1).

Для приготовления исходного разведения отбирают от анализируемой пробы навеску *x* г или *x* мл и растворяют ее в 9*x* мл BPW (5.1). Таким образом, получают исходное (10^{-1}) разведение.

Примечание – 10 мл исходного (10^{-1}) разведения содержат эквивалент 1 г или 1 мл пробы.

Каждое последующее разведение получают путем добавления 1 мл предыдущего разведения продукта к 9 мл BPW.

Переносят 10 мл объема исходного (10^{-1}) разведения в пробирки (6.5) в трехкратной повторности. Затем переносят 1 мл объема каждого последующего разведения в пробирки, содержащие 9 мл BPW, в трехкратной повторности (см. приложение В).

9.3.2 Неселективное предварительное обогащение

Инкубируют исходное разведение и ряд 10-кратных разведений (всего 9 пробирок) (см. 9.3.1) при температуре 37 °С в течение (18 ± 2) ч.

9.3.3 Селективное обогащение

Переносят 1 мл культур, полученных по 9.3.2, в пробирки, содержащие по 10 мл среды для селективного обогащения (5.2.1).

Инкубируют посевы при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч.

9.4 Выделение и идентификация культур

9.4.1 Выделение

Используя петлю (6.8), пересевают культуры из инкубируемой среды для селективного обогащения (см. 9.2.3) или из каждой инкубированной пробирки (см. 9.3.3) штрихами на поверхность чашки Петри, содержащей селективную среду (5.2.2), и инкубируют при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч.

9.4.2 Выбор колоний для подтверждения принадлежности

Характерные колонии имеют цвет от розового до темно-красного (с металлическим блеском и без него).

Из чашек с посевами (см. 9.4.1), на которых развились характерные колонии, выбирают хорошо изолированную характерную колонию для пересева (см. 9.5) с целью биохимического подтверждения принадлежности данных колоний к бактериям семейства Enterobacteriaceae (см. 9.6).

Если на чашке Петри присутствуют колонии различной морфологии, выбирают по одной колонии каждой морфологии.

Некоторые бактерии семейства Enterobacteriaceae могут обусловливать обесцвечивание своих колоний или питательных сред. Следовательно, если отсутствуют характерные колонии, для подтверждения выбирают беловатые колонии.

9.5 Пересев отобранных колоний

Каждую из колоний, выбранную для подтверждения принадлежности (см. 9.4.2), штрихами пересевают на чашки Петри с полноценным питательным агаром (5.2.3).

Инкубируют эти чашки при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч.

Выбирают хорошо изолированную колонию из каждой инкубированной чашки для проведения испытаний на биохимическое подтверждение принадлежности к бактериям семейства Enterobacteriaceae (см. 9.6).

9.6 Биохимическое подтверждение принадлежности к бактериям семейства Enterobacteriaceae

9.6.1 Тест по определению наличия оксидазы

Используя платиново-иридиевую петлю, проволоку или стеклянную палочку (6.8), отбирают каждую хорошо изолированную колонию (см. 9.5) и наносят штрихи на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом оксидазы (5.3), или на имеющийся в продаже диск. Нельзя использовать никель-хромовую петлю или проволоку.

Результат испытания считают отрицательным, если фильтровальная бумага не потемнела в течение 10 с.

Следуют инструкциям изготовителя при использовании дисков, готовых к применению.

9.6.2 Тест по ферментации глюкозы

С помощью петли (6.8) вносят колонии, отобранные согласно 9.5, которые дали отрицательную реакцию на оксидазу, в пробирки, содержащие глюкозный агар (5.2.4).

Инкубируют эти пробирки при температуре 37 °С в течение (24 ± 2) ч.

Если содержимое пробирки приобретает желтый цвет, реакцию рассматривают как положительную.

10 Выражение результатов

10.1 Подтвержденные положительные пробирки

Если какие-либо выбранные типичные колонии (см. 9.4.2) из пересева (см. 9.4.1) являются оксидазо-отрицательными и глюкозо-положительными, то пробирка, из которой был произведен пересев, должна рассматриваться как положительная по наличию бактерий семейства Enterobacteriaceae.

10.2 Метод обнаружения

В соответствии с интерпретацией полученных результатов (см. 10.1) указывают присутствие или отсутствие бактерий семейства Enterobacteriaceae в навеске *x* г или *x* мл от пробы продукции (см. ISO 7218).

10.3 Метод подсчета: вычисление наиболее вероятного числа (MPN)

Вычисляют наиболее вероятное число из числа положительных пробирок при каждом разведении. См. ISO 7218:1996 (подраздел 9.4).

11 Прецизионность

Известно, что при использовании метода MPN наблюдается широкий разброс результатов. К результатам, полученным с помощью данного метода, следовательно, следует относиться с осторожностью. Доверительные пределы приводятся в ISO 7218:1996 (приложение A).

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать следующее:

– всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

– используемый метод отбора проб, если он известен;

– используемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

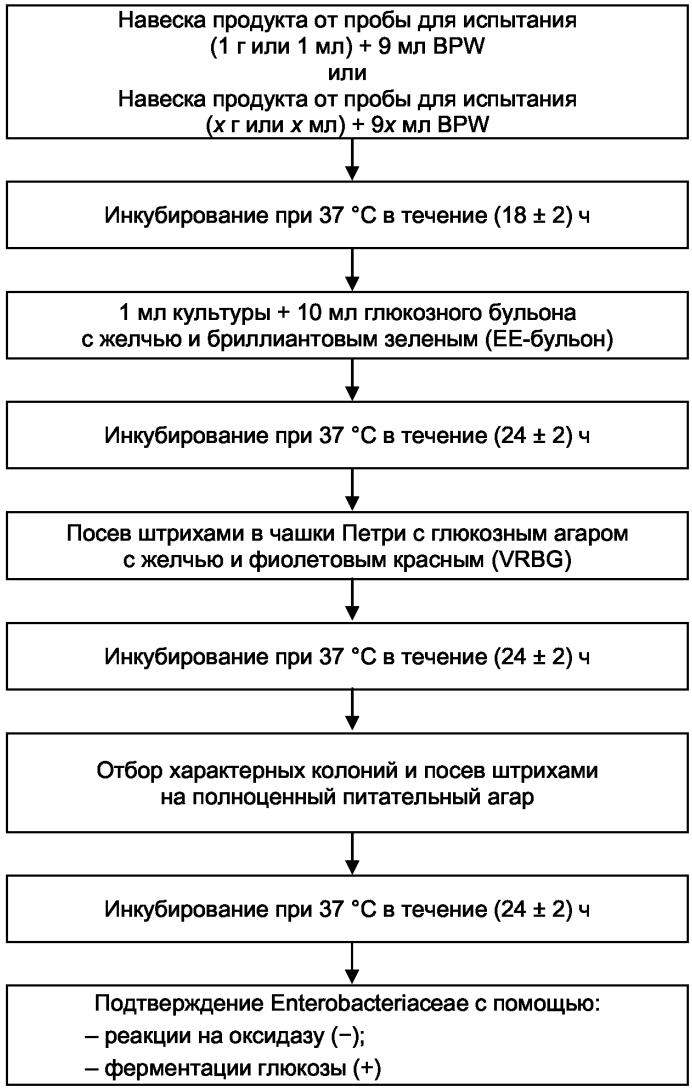
– используемую температуру инкубации;

– все детали работы, не оговоренные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с подробностями любых случайностей, которые могли повлиять на результаты испытаний;

– полученные результаты испытания.

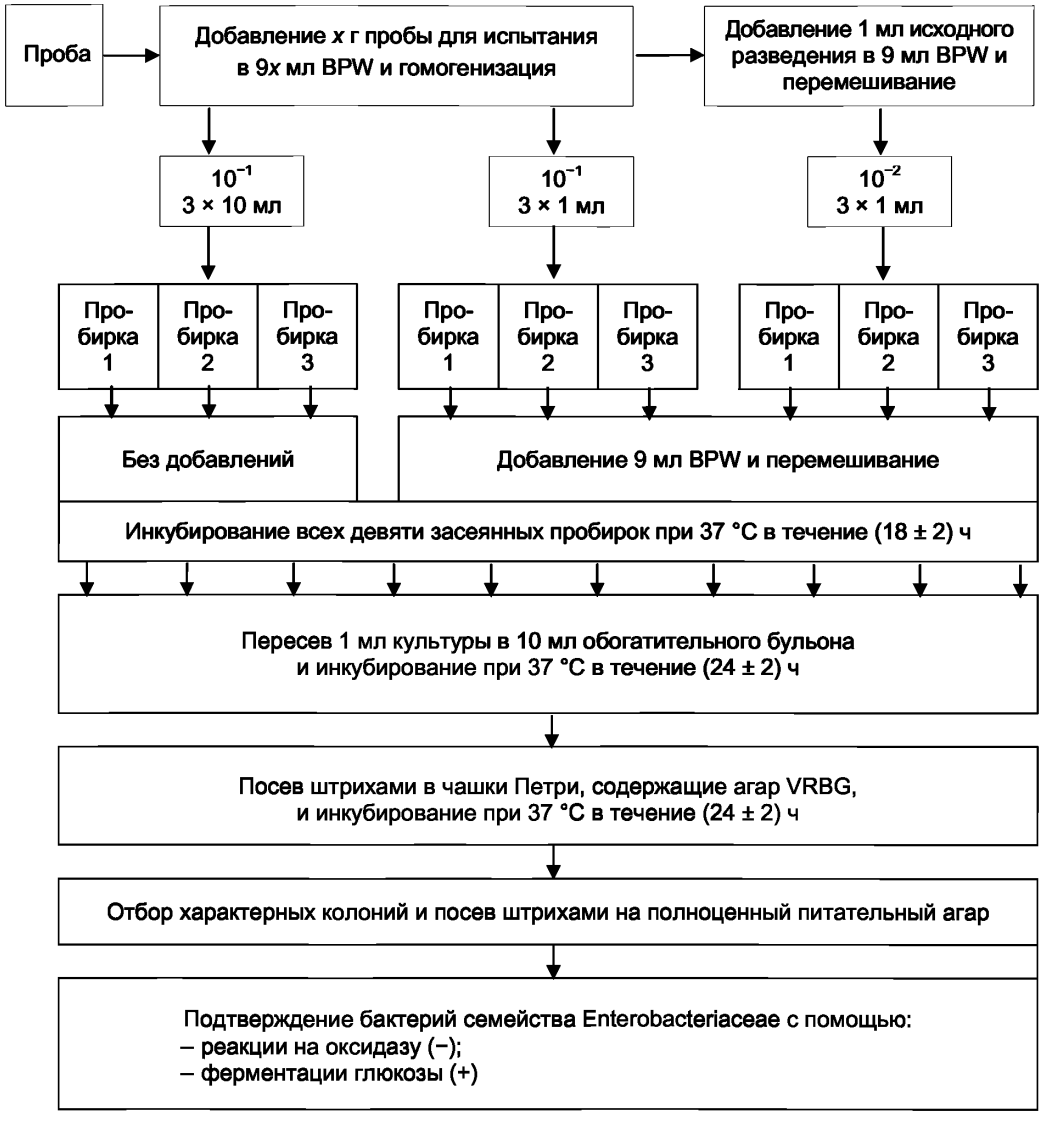
Приложение А
(обязательное)

Схема процедуры для метода обнаружения



Приложение В
(обязательное)

Схема процедуры для метода MPN



Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 25.02.2010. Подписано в печать 10.03.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,86 Уч.- изд. л. 0,72 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552634 от 17.11.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru