ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 51426— 2016

МИКРОБИОЛОГИЯ

Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

(ISO 6887-1:1999, NEQ)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминно-минеральные концентраты, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 октября 2016 г. № 1521-ст

4 Настоящий стандарт разработан с учетом основных нормативных положений международного стандарта ИСО 6887-1:1999 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений» (ISO 6887-1:1999 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions», NEQ).

5 ВЗАМЕН ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83)

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона «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

© Стандартинформ, 2016

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

Введение

Ввиду большого разнообразия кормов, комбикормов и комбикормового сырья данный горизонтальный метод может быть неприменимым для исследования определенной продукции. Если необходимо и диктуется вескими техническими причинами, то рекомендуется использовать другие методы, специально разработанные для этого вида продукции. Тем не менее, необходимо приложить все усилия, чтобы применять именно данный горизонтальный метод.

Настоящий стандарт разработан с учетом основных нормативных положений международного стандарта ISO 6887—1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions) [1]. Настоящий стандарт устанавливает общие правила аэробного приготовления исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований продуктов, предназначенных для потребления животными.

Первая часть ИСО 6887 устанавливает общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования.

Для ряда проб при подготовке исходной суспензии, в зависимости от физического состояния (например, сухая или очень густая проба) или присутствия ингибиторов или кислотности и т. д. необходимо применять специальные меры.

В этих случаях рекомендуется использовать специальные разбавители или методики приготовления исходной суспензии, предназначенные для определенных проб в соответствующем специальном стандарте. К ним относятся:

- доведение pH суспензии пробы до нейтрального значения;
- использование только пептонной воды с буферным раствором (и никаких других разбавителей) для проб с высоким ингибиторным эффектом или продукции, содержащей микроорганизмы, испытывающие стресс (например, кислотный pH);
- специальные методики повторного гидрирования проб с низкой активностью воды для ослабления осмотического шока;
- применение подходящих температур для получения суспензии;
- методики оживления для реабилитации микроорганизмов в стрессовом состоянии, полученном в результате обработки и хранения проб;
- методики гомогенизации и продолжительность процедур, специфические для определенных проб (например, зерновых) и/или некоторых определяемых микроорганизмов (например, дрожжей и плесеней);
- применение поверхностно-активных веществ для проб с высоким содержанием жиров.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ

Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

Microbiology. Feedstuffs, compound feeds, feed raw materials.
General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма и комбикормовое сырье и устанавливает общие правила аэробного приготовления исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований.

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 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

ГОСТ 12.2.007.0 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

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

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

Издание официальное

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 и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **исходная суспензия, первичное разведение (initial suspension, primary dilution):** Суспензия, раствор или эмульсия, полученные путем смешивания определенной массы или объема исследуемой продукции (или анализируемой пробы, отобранной от продукции) с девятикратным объемом разбавителя; при наличии крупных частиц твердой дисперсной фазы суспензию выдерживают до их осаждения.

3.2 **ряд десятикратных разведений (further decimal dilutions):** Суспензии или растворы, полученные путем смешивания определенного объема исходной суспензии (см. 3.1) с девятикратным объемом разбавителя и повторением этой процедуры с каждым последующим разведением, приготовленным подобным путем, с целью получения нужного разведения, пригодного для инокуляции в питательную среду.

3.3 **специальный стандарт (specific standard):** Стандарт или руководство, описывающее исследование специальных видов продукции (или группы) для обнаружения или подсчета микроорганизмов определенного вида (или группы микроорганизмов).

4 Сущность метода

Сущность метода заключается в приготовлении исходной суспензии (см. 3.1) с равномерным, насколько это возможно, распределением микроорганизмов, содержащихся в навеске.

При необходимости готовят ряд десятикратных разведений (см. 3.2) с целью сокращения количества микроорганизмов в единице объема, чтобы после инкубации наблюдать растут они или нет (при посеве в жидкие питательные среды) или подсчитать число колоний (в случае плотных питательных сред), как установлено в соответствующем специальном стандарте.

Примечание — Чтобы ограничить диапазон подсчета микроорганизмов в заданном интервале или если предполагается большое количество микроорганизмов, допускается производить посев только с тех десятикратных разведений (не менее двух последовательных разведений), необходимых для подсчета количества микроорганизмов в соответствии с формулой по ГОСТ ISO 7218.

5 Требования безопасности

5.1 При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования безопасности при работе с микроорганизмами по ГОСТ ISO 7218.

5.2 При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроприборами по ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ Р 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на используемые приборы.

5.3 Помещение должно быть оснащено вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021, средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004.

5.4 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

6 Требования к проведению испытаний

6.1 Условия проведения испытаний

При подготовке и проведении испытаний должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды . . . . . от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . не более 80 %;

- атмосферное давление . . . . . от 84,0 до 106,7 кПа;
- напряжение в сети. . . . . от 198 до 242 В.

6.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке их результатов допускают специалиста, соответствующего требованиям к персоналу по ГОСТ ISO 7218 (раздел 4).

7 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Используют лабораторное оборудование для микробиологических исследований, соответствующее требованиям ГОСТ ISO 7218 (раздел 5):

- смесительное оборудование;
- pH-метр;
- автоклав;
- термостат;
- холодильник;
- стерилизационный сушильный шкаф;
- дозатор (устройство для разливки) питательных сред и реактивов;
- нагревательная плитка;
- дистиллятор.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ R OIML 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ±0,01 г.

Колбы по ГОСТ 1770 или флаконы вместимостью, достаточной для того, чтобы поместить 90 $см^3$ разбавителя, используемого для приготовления исходной суспензии, или количество, кратное 90 $см^3$.

Пробирки ГОСТ 1770 вместимостью, достаточной для того, чтобы поместить и оставить сверху пространство, необходимое для перемешивания 10 $см^3$ (или количества, кратного 10 $см^3$) пробы жидкого продукта или исходной суспензии, или дальнейших десятикратных разведений.

Пипетки градуированные, вымеряемые на слив жидкости от любой отметки до сливного кончика 2(5)–1(2)–1(2)–1(10) по ГОСТ 29227.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172, х. ч.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.

8 Отбор проб

Отбор проб в соответствии ГОСТ ISO 7218 (подраздел 8.1) и с нормативными документами на анализируемые продукты.

9 Подготовка проб

Подготовка проб к испытанию — по ГОСТ ISO 6498.

10 Разбавители

10.1 Основные материалы

Для улучшения воспроизводимости результатов при приготовлении разбавителя рекомендуется использовать обезвоженные основные компоненты или обезвоженный готовый препарат. Следует строго соблюдать инструкции изготовителя.

Химические реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч.д.а. и пригодными для микробиологических исследований.

Используемая вода должна быть дистиллированной или деионизованной.

10.2 Разбавители общего назначения

10.2.1 Пептонно-солевой раствор

10.2.1.1 Состав:

- пептон – 1,0 г;
- натрий хлористый – 8,5 г;
- вода – 1000 $см^3$.

10.2.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, подогревая при необходимости.

Доводят значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно было равно 7,0 ± 0,2 при температуре 25 °С.

10.2.2 Забуференная пептонная вода

10.2.2.1 Состав

- пептон — 10,0 г;
- натрий хлористый — 5,0 г;
- натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12- водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) — 9,0 г;
- калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) —1,5 г;
- вода — 1000 $см^3$.

10.2.2.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, при необходимости подогревая.

Доводят значение pH таким образом, чтобы после стерилизации оно было равно 7,0 ± 0,2 при температуре 25 °С.

10.3 Разбавители для специальных целей

Разбавители для специальных целей указаны в специальном стандарте, подходящем к анализируемому продукту.

10.4 Распределение и стерилизация разбавителя

Разбавитель (см. 10.2 или 10.3) разливают в объемах, необходимых для приготовления исходных суспензий по флаконам подходящей вместимости.

Разбавитель (см. 10.2 или 10.3) разливают в объемах, необходимых для приготовления десятикратных разведений по пробиркам или флаконам в таких количествах, чтобы после стерилизации каждая пробирка или флакон содержал 9,0 $см^3$. Изменение конечного объема после стерилизации не должно превышать ±2 %.

Примечание — Если предполагается исследовать несколько групп микроорганизмов, используя различные среды для их выращивания, может возникнуть необходимость распределения всех разбавителей (или некоторых из них) в количестве, превышающем 9,0 $см^3$; размер колб и пробирок устанавливается в соответствии с объемом разбавителя.

Пробирки или флаконы закрывают и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Если разбавитель не используют сразу, его хранят в темноте при температуре от 0 °С до 5 °С не более 1 мес в условиях, не допускающих никаких изменений в его объеме и составе.

11 Проведение разведений

11.1 Навеска и исходная суспензия (первичное разведение)

В стерильную чашку или стерильный пластиковый пакет берут навеску массой m, г, с погрешностью взвешивания ±5 %, или отмеряют объем V, $см^3$, с погрешностью измерения ±5 % (если не указано иначе, минимальное значение массы составляет 10 г, объема — 10 $см^3$), представительные для данной пробы для испытания (см. раздел 9).

Добавляют девятикратное количество (по массе или объему) разбавителя. Это количество рекомендуется измерять с погрешностью измерения ±5 %.

Примечания

1 В некоторых случаях, особенно для проб, имеющих слишком вязкую или слишком густую исходную консистенцию, может возникнуть необходимость увеличить объем разбавителя. Этот объем необходимо учитывать в расчете для последующих операций и/или при выражении результатов.

2 Первичное разведение отчасти обуславливает значение нижнего предела подсчета, который также зависит и от применяемой техники (например, способа разлива по чашкам 1 $см^3$ посевного материала исходной суспензии, для которого пределом подсчета является 10 микроорганизмов на грамм). Если для подсчета в определенных пробах необходимо опуститься ниже этого предела, то можно использовать меньший объем разбавителя[1]. Следует отметить, что инокуляция такой исходной суспензии может вызвать затруднения в результате дисбаланса в соотношении количества исходной суспензии и среды (ингибирования микробного роста вследствие увеличения концентрации компонентов питательной среды).

Чтобы избежать повреждения микроорганизмов при неожиданных изменениях температуры, температура разбавителя во время описанной ниже работы, должна быть примерно равна температуре окружающего воздуха, за исключением испытания определенных проб (см. специальный стандарт).

Смесь гомогенизируют в соответствии с рекомендациями ГОСТ ISO 7218 (подразделы 5.4, 5.19).

Если необходимо, дают отстояться крупным частицам в течение 15 мин. Можно использовать системы фильтрования, дающие сопоставимые результаты.

В случае подсчета спор, после приготовления исходной суспензии необходимо немедленно провести ее тепловую обработку, например, в течение 10 мин при температуре 80 °С, с последующим быстрым охлаждением.

11.2 Ряд десятикратных разведений

Пипеткой переносят 1 $см^3$ исходной суспензии с погрешностью измерения[2] ± 5 % в пробирку, содержащую 9 $см^3$ стерильного разбавителя соответствующей температуры.

Примечание — Если необходим больший объем десятикратного разведения, можно добавить определенный объем (свыше 1 $см^3$) исходной суспензии с погрешностью измерения ±5 % в пробирку, содержащую девятикратный объем стерильного разбавителя при необходимой температуре.

Для достижения оптимальной точности пипетку погружают в исходную суспензию на глубину не более 1 см.

Стараются избегать любого контакта между пипеткой с посевным материалом и стерильным разбавителем.

Полученный раствор тщательно перемешивают, желательно с помощью механической мешалки, в течение 5—10 с, чтобы получить 10^{-2} разведение.

При необходимости повторяют эти операции, используя 10^{-2} и дальнейшие разведения, применяя для каждого разведения новую стерильную пипетку, чтобы получить 10^{-3}, 10^{-4} и т. д. разведения, пока не будет получено необходимое количество микроорганизмов (см. 4).

11.3 Продолжительность процедуры

Промежуток времени между окончанием приготовления исходной суспензии и моментом, когда посевной материал входит в контакт с питательной средой, не должен превышать 45 мин, тогда как промежуток времени между приготовлением исходной суспензии (см. 11.1) и началом приготовления следующих десятикратных разбавлений ограничен до 30 мин, если не установлено иначе в специальном стандарте.

Примечание — Если температура окружающего воздуха в лаборатории слишком высокая, то оба эти промежутка времени должны быть сокращены.

---

[1] В этом случае используемый объем разбавителя должен быть указан в протоколе испытания.

[2] Погрешность измерения ±5 % учитывает имеющиеся ограничения используемых в настоящее время пипеток.

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120 07.100.30 С19

Ключевые слова: микробиология, корма, комбикорма, комбикормовое сырье, исходная суспензия, десятикратные разведения, разбавители, пептонно-солевой раствор, забуференная пептонная вода, стерилизация

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 31.10.2016. Подписано в печать 08.11.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,12. Тираж 40 экз. Зак. 2757.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru