МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33379— 2015

УДОБРЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИЕ

Методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт органических удобрений и торфа» (ФГБНУ «ВНИИОУ») и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» (ФГБНУ «ВНИИВСГЭ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 ноября 2015 г. № 1802-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33379—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 3
4 Общие положения 4
4.1 Общие требования 4
4.2 Требования безопасности 4
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, питательные среды, посуда и материалы 5
6 Подготовка к проведению анализа 8
6.1 Подготовка лабораторных помещений 8
6.2 Стерилизация посуды, инструментов, материалов и питательных сред 8
6.3 Приготовление сред и реактивов 9
7 Отбор и подготовка проб 13
7.1 Общие требования 13
7.2 Отбор проб 13
7.3 Транспортирование и хранение проб 13
8 Проведение анализа 13
8.1 Общие положения 13
8.2 Определение общего микробного числа (ОМЧ) и спорообразующих микроорганизмов 16
8.3 Определение патогенных клостридий 17
8.4 Определение бактерий группы кишечных палочек 17
8.5 Определение бактерий рода Salmonella (сальмонелл) 19
8.6 Определение бактерий рода Staphylococcus (стафилококков) 21
Приложение А (справочное) Дезинфицирующие растворы 22
Приложение Б (справочное) Способы и продолжительность стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов 23
Приложение В (справочное) Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем 25
Приложение Г (справочное) Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди) 26

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

УДОБРЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИЕ

Методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Organic fertilizers. Methods for determining the presence of pathogenic and potentially pathogenic microorganisms

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на органические удобрения и устанавливает методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 22.0.04—97 Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Биолого-социальные чрезвычайные ситуации. Термины и определения

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 171—81 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ 195—77 Реактивы. Натрий сернистокислый. Технические условия

ГОСТ 244—76 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 480—78 Пластины асбестоцеллюлозные фильтрующие и стерилизующие. Технические условия

ГОСТ 1341—97 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 1820—2001 Спички. Технические условия

ГОСТ 2081—2010 Карбамид. Технические условия

ГОСТ 2493—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 4025—95 Мясорубки бытовые. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4147—74 Реактивы. Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4148—78 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4159—79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4209—77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4232—74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрий гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4919.1—77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038—79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6259—75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 9871—75 Термометры стеклянные ртутные электроконтактные и терморегуляторы. Технические условия

ГОСТ 10354—82 Пленка полиэтиленовая. Технические условия

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ ISO/TS 11133-1—2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

ГОСТ 11311—76 Фенол каменноугольный. Технические условия

ГОСТ 11773—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739—78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 15530—93 Парусины и двунитки. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 17151—81 Посуда хозяйственная из листового алюминия. Общие технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17308—88 Шпагаты. Технические условия

ГОСТ 17811—78 Мешки полиэтиленовые для химической продукции. Технические условия

ГОСТ 19126—2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

ГОСТ 19808—86 Стекло медицинское. Марки

ГОСТ 20432—83 Удобрения. Термины и определения

ГОСТ 20490—75 Реактивы. Калий марганцовокислый. Технические условия

ГОСТ 20729—75 Питательные среды. Вода мясная (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 20730—75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 21239—93 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22649—83 Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия

ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калий гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706—83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26713—85 Удобрения органические. Метод определения влаги и сухого остатка

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29112—91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31598—2012 (EN 285:1996) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31744—2012 (ISO 7937:2004) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод подсчета колоний Clostridium perfringens

ГОСТ 31828—2012 Аппараты и установки сушильные и выпарные. Требования безопасности. Методы испытаний

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 22.0.04 и ГОСТ 20432, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бактерии вида *Clostridium perfringens*:** Грамположительные, спорообразующие палочки с закругленными концами, редуцирующие сульфит натрия на железосульфитном агаре при температуре 44 °С в течение 16—18 ч.

3.2

бактерии вида *Escherichia coli*, *E.coli*: Аэробные и факультативно-анаэробные термоустойчивые колиформные бактерии, ферментирующие лактозу или маннитол при температуре 44 °С в течение 24 ч с образованием кислоты и газа, а также производящие индол из триптофана.

[ГОСТ 30813—2002, статья 65]

3.3 **бактерии вида *Staphylococcus aureus*,** *S. aureus*: Коагулазоположительные бактерии, образующие ацетоин и ферментирующие мальтозу в аэробных условиях.

3.4 **бактерии группы кишечных палочек; БГКП, колиформные бактерии:** Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (энтеробактерий) родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*; бесспоровые, грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа.

3.5 **бактерии рода *Salmonella*:** Грамотрицательные факультативно-анаэробные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, сбраживающие углеводы и спирты с образованием кислоты и газа, не разлагающие лактозу, сахарозу и мочевину, восстанавливающие нитраты, не образующие индол, в реакции Фогес-Проскуэра не образующие ацетоин.

3.6 **бактерии семейства *Micrococcaceae* рода *Staphylococcus*:** Грамположительные бактерии, имеющие шаровидную форму, не имеющие жгутиков и не образующие капсул и спор, располагающиеся в виде неправильных скоплений, напоминающих гроздья винограда.

Примечание — В длительно хранимых культурах некоторые клетки могут окрашиваться как грамотрицательные.

3.7 **ветеринарно-санитарный анализ:** Определение в органическом удобрении наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

3.8 **коли-индекс:** Количество кишечных палочек в 1 $дм^3$ (кг) органического удобрения.

3.9 **коли-титр:** Наименьшее количество органического удобрения ($см^3$, г), в котором обнаружены бактерии группы кишечной палочки.

3.10

общее микробное число; ОМЧ: Общее число мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37 °С в течение 24 ч, видимые с увеличением в два раза.

[ГОСТ 30813—2002, статья 60]

3.11

общие колиформные бактерии; общие колиформы: Грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 37 °С в течение 24—48 ч.

[ГОСТ 30813—2002, статья 63]

3.12 **степень микробного загрязнения:** Отношение фактической численности санитарно-показательных микроорганизмов в органическом удобрении к ее допустимым значениям.

3.13 **степень обеззараживания (дезинвазии, дезинфекции) органических удобрений:** Отсутствие или гибель возбудителей паразитарных болезней (яиц и личинок гельминтов, цист и ооцист паразитических простейших), а также гибель санитарно-показательных микроорганизмов в 10 г или 10 $см^3$ пробы органического удобрения.

Примечание — Степень обеззараживания (дезинвазии, дезинфекции) органического удобрения при контаминации малоустойчивыми возбудителями болезней определяют по выживаемости БГКП; возбудителями повышенной устойчивости, в т. ч. возбудителями туберкулеза, — по стафилококкам и энтерококкам; спорообразующей микрофлорой — по микроорганизмам рода *Bacillus*.

3.14

сульфитредуцирующие клостридии: Спорообразующие анаэрбные палочковидные бактерии, редуцирующие сульфиты до сульфидов.

[ГОСТ 30813—2002, статья 66]

3.15 **титр патогенных клостридий:** Наименьшее количество органического удобрения ($см^3$, г), в котором обнаружена бактерия *Clostridium perfringens*.

3.16 **условно-патогенные микроорганизмы:** Микроорганизмы, которые в обычных условиях обитания в организме человека или животных не вызывают инфекционного процесса, но могут стать причиной заболевания.

4 Общие положения

4.1 Общие требования

4.1.1 Общие требования проведения ветеринарно-санитарного анализа и требования к персоналу — по ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Требования безопасности при работе с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами — по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт; с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019. Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, питательные среды, посуда и материалы

5.1 При проведении ветеринарно-санитарного анализа используют следующие средства измерений и вспомогательное оборудование:

- pH-метр, обеспечивающий измерение с погрешностью ± 0,01 ед. pH;
- весы по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальным пределом взвешивания 160 и 1000 г и пределом допускаемой абсолютной погрешности взвешивания ± 5 мг и ± 10 мг соответственно;
- термометры ртутные электроконтактные ТПК по ГОСТ 9871;
- термометры жидкостные стеклянные с диапазоном измерения температур от 0 °С до 50 °С и от 50 °С до 100 °С по ГОСТ 28498;
- баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 20 °С до 100 °С с отклонением 1 °С от заданной;
- встряхиватель;
- гомогенизатор или смеситель лабораторный;
- мясорубка по ГОСТ 4025;
- дистиллятор электрический, обеспечивающий качество дистиллированной воды требованиям ГОСТ 6709;
- шкаф ламинарный;
- микроскоп световой биологический с бинокулярной насадкой, обеспечивающий просмотр в проходящем свете с увеличением 40—1000×;
- прибор нагревательный для варки сред из сухих препаратов, кипячения мембранных фильтров, расплавления питательного агара;
- плитка электрическая по ГОСТ 14919;
- прибор для счета колоний микроорганизмов;
- прибор для окраски предметных стекол или ванночка эмалированная с мостиком;
- термостат с диапазоном рабочих температур от 28 °С до 55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью ± 1 °С;
- стерилизаторы паровые медицинские по ГОСТ 31598;
- стерилизатор электрический суховоздушный, обеспечивающий параметры режима стерилизации со значениями температуры от 160 °С до 200 °С и времени от 45 до 150 мин с отклонением температуры не более ± 3 °С, отклонением времени стерилизационной выдержки не более ± 5 мин от заданной по ГОСТ 22649;
- холодильник портативный или термоконтейнер с емкостями для горячей воды или льда;
- холодильник электрический бытовой любого класса (SN, N, ST/T), позволяющий поддерживать температуру не более 5 °С, по ГОСТ 16317;
- шкаф сушильный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С по ГОСТ 31828;
- горелки газовые.

5.2 При проведении ветеринарно-санитарного анализа используют следующие реактивы:

- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- агар питательный сухой;
- аммоний-железа (II) сульфат;
- бульон питательный сухой;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
- вода питьевая по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- вода мясная по ГОСТ 20729;
- глицерин по ГОСТ 6259;
- *D*-глюкоза по ГОСТ 6038;
- *DL*-триптофан;
- пара-диметиламинобензальдегид;
- дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171;
- железо (II) сернокислое 7-водное по ГОСТ 4148;
- железо (III) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147;
- желчь говяжья сухая или натуральная;
- йод кристаллический по ГОСТ 4159;

- казеина гидролизат панкреатический сухой или жидкий с содержанием аминного азота 500 мг;
- калия гидроокись по ГОСТ 24363;
- калий йодистый по ГОСТ 4232;
- калий марганцовокислый по ГОСТ 20490;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493;
- карбамид (мочевина) по ГОСТ 2081;
- кислота соляная по ГОСТ 3118;
- лактоза 1-водная;
- *L*-лизин или *L*-лизин монохлорид;
- масло иммерсионное для микроскопов по ГОСТ 13739;
- магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523;
- магний хлористый по ГОСТ 4209;
- Д (-) маннит, ч. д. а.;
- набор реактивов для приготовления среды Вильсона — Блера по 6.2.18;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- натрий селенитовый кислый;
- натрий сернокислый по ГОСТ 195;
- натрия тиосульфат по ГОСТ 244;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- α-нафтол;
- неомицин с биологической активностью 50000 ЕД;
- пептон сухой ферментативный для бактериологических целей ГОСТ 13805;
- полимиксин с биологической активностью 2000000 ЕД;
- реактив для оксидазного теста по 6.3.3.2;
- реактив Ковача;
- реактив Эрлиха;
- салицин;
- системы индикаторные бумажные (СИБ):
  СИБ — лактоза;
  СИБ — оксидаза;
- спирт этиловый ректификованный пищевой по ГОСТ 5962;
- 2,3,5 трифенил тетразолий хлорид (ТТХ);
- соединения фенилендиаминовые;
- фенол каменноугольный (кислота карболовая) по ГОСТ 11311;
- бриллиантовый зеленый;
- бромкрезоловый пурпуровый по ГОСТ 4919.1;
- генциановый фиолетовый (генцианвиолет);
- индикатор Андреде;
- кристаллический фиолетовый;
- феноловый красный по ГОСТ 4919.1;
- фуксиносновной.

5.3 При проведении ветеринарно-санитарного анализа используют следующие питательные среды и материалы:

- агар висмут-сульфит;
- агар водный по 6.3.2.3;
- агар железо-сульфитный;
- агар Кристенсена с мочевиной;
- агар мясопептонный (МПА) по ГОСТ 29112;
- агар мясопептонный полужидкий;
- агар питательный по 6.3.2.1;
- агар питательный полужидкий по 6.3.2.2;
- агар розоловый;
- агар трехсахарный (TSI-агар) или агар Олькеницкого;

- агар Чепмена по 6.3.2.12;
- бульон глюкозо-пептонный по 6.3.2.13;
- бульон лактозный с ТТХ по 6.3.2.8;
- бульон мясопептонный (МПБ) по ГОСТ 20730;
- бульон (агар) мясопептонный с глюкозой по 6.3.2.6;
- бульон питательный;
- бульон селенитовый по Лейфсону по 6.3.2.9;
- вода пептонная по 6.3.2.4;
- среда Вильсона — Блера по 6.3.2.18;
- среда с лизином по 6.3.2.16;
- среда Гисса с маннитом;
- среда Гисса с сахарозой;
- среда из сухого питательного агара;
- среда комбинированная по Олькеницкому по 6.3.2.15;
- среда Левина;
- среда магниевая по 6.3.2.11;
- среда Кесслера-Свенертона по 6.3.2.7;
- среда на индол с триптофаном по 6.3.2.14;
- среда с салицином по 6.3.2.17;
- среда Плоскирева;
- среда полужидкая с глюкозой по 6.3.2.10;
- среда полужидкая с лактозой;
- среда сульфит-полимиксин-неомициновая по 6.3.2.19;
- среда Эндо.

Допускается использование других готовых и сухих (дегидратированных) культуральных сред, предназначенных для целей, указанных в настоящем стандарте.

5.4 При проведении ветеринарно-санитарного анализа используют следующие посуду и материалы:

- колбы широкогорлые специальные для стерилизации и хранения питательных сред из термостойкого стекла вместимостью 500 $см^3$ с герметично завинчивающимися крышками;
- банки стеклянные с притертыми пробками разной вместимости до 1000 $см^3$;
- кастрюли разной вместимостью по ГОСТ 17151;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29227;
- посуда лабораторная стеклянная (стаканы, воронки, стеклянные палочки, чашки Петри, цилиндры, колбы, чашки лабораторные, спиртовки, пробирки) по ГОСТ 23932 и ГОСТ 25336;
- посуда мерная лабораторная стеклянная (цилиндры с носиком, мензурки, колбы, пробирки и т. д.) различной вместимости по ГОСТ 1770;
- промывалки;
- флаконы вместимостью 100—200 $см^3$;
- чашки, стаканы фарфоровые, ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147;
- бюксы металлические, стеклянные;
- дозаторы для разлива питательных сред;
- дозаторы пипеточные;
- парусина (брезент) грубая плотная водонепроницаемая по ГОСТ 15530;
- бумага пергаментная по ГОСТ 1341;
- бумага индикаторная по ГОСТ 4919.1;
- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- груши резиновые разных размеров;
- карандаши по стеклу (стеклографы);
- маркеры по стеклу;
- тушь черная;
- лампа ультрафиолетовая с длиной волны 254 нм;
- линейки измерительные металлические по ГОСТ 427;
- лупы складные карманные с увеличением в 4—10 раз по ГОСТ 25706;
- марля по ГОСТ 9412;

- мешки полиэтиленовые по ГОСТ 17811;
- ножницы анатомические по ГОСТ 19126;
- ножницы хирургические по ГОСТ 21239;
- пакеты полиэтиленовые;
- перчатки резиновые;
- петли бактериологические;
- пинцеты анатомические по ГОСТ 21241;
- пластины асбестоцеллюлозные фильтрующие и стерилизующие по ГОСТ 480;
- пленка полиэтиленовая по ГОСТ 10354;
- пробки (силиконовые, ватно-марлевые, резиновые) конусные, выдерживающие стерилизацию сухим жаром;
- сита почвенные с размером диаметра ячеек 0,50; 0,30 и 0,25 мм^2;
- спички по ГОСТ 1820;
- стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
- стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
- стекло медицинское по ГОСТ 19808;
- фартук клеенчатый;
- фильтры мембранные со средним размером диаметра пор 0,5 мкм и планктонные с размером диаметра пор 3—5 мкм, диска — 35 мм;
- фильтры обеззоленные;
- часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145;
- шпагат по ГОСТ 17308;
- шпатели пластмассовые и металлические по ГОСТ 19126;
- штатив для пробирок.

5.5 Допускается применение других средств измерений, посуды, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов, питательных сред и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Подготовка лабораторных помещений

6.1.1 Помещения лабораторий, в которых проводят ветеринарно-санитарный анализ, содержат в чистоте, регулярно проводя их гигиеническую уборку и обработку с применением дезинфицирующих средств.

Дезинфекцию воздуха проводят проветриванием, продолжительностью не менее 30—60 мин. Перед проведением анализа и после гигиенической уборки включают бактерицидную лампу на 60 мин.

6.1.2 Пол, стены и мебель периодически обрабатывают пылесосом и протирают растворами дезинфицирующих веществ (см. приложение А).

6.1.3 Рабочий стол до начала и после анализа дезинфицируют раствором хлорамина, а также 70 %-ным (по объему) этиловым или изопропиловым спиртом. Раствором спирта также дезинфицируют руки.

6.2 Стерилизация посуды, инструментов, материалов и питательных сред

6.2.1 Посуда, инструменты и материалы, используемые при ветеринарно-санитарном анализе, должны быть стерильными.

6.2.2 Стеклянную посуду обеззараживают стерилизацией сухим жаром в сушильных шкафах при температуре 165 °С — 170 °С в течение двух часов. Следует учитывать, что повышение температуры более 170 °С вызывает разрушение ватных пробок и бумаги.

6.2.3 Посуду перед стерилизацией тщательно моют водопроводной водой, новую посуду предварительно кипятят в течение 15 мин в мыльной воде. При сильном загрязнении посуду кипятят еще в течение 10—15 мин в 10 %-ном растворе соляной кислоты и снова ополаскивают водопроводной водой.

6.2.4 Перед стерилизацией стеклянную посуду (колбы, пробирки) закрывают ватными пробками, которые обвязывают плотной (пергаментной, крафт) бумагой. Чашки Петри кладут одна на другую по

три-пять штук на середину листа плотной бумаги, два противоположных края которой загибают. В плоские (верхние) концы пипеток вставляют ватные тампоны. Пипетки и шпатели стерилизуют завернутыми в бумагу или в футляре (пенале) для стерилизации. По окончании стерилизации сушильный шкаф не открывают до снижения температуры до 75 °С — 100 °С, так как под действием холодного воздуха стекло может лопнуть.

6.2.5 Мелкие металлические инструменты (иглы, пинцеты, петли, ножницы), а также стеклянные палочки, горлышки колб, пробирок, бутылок стерилизуют прокаливанием (фламбированием) в пламени горелки непосредственно перед использованием. Также в пламени горелки кратковременно обжигают ватные пробки при пересеве культур и разливе сред.

6.2.6 Питательные среды и другие лабораторные материалы стерилизуют насыщенным паром под давлением (автоклавированием), так как при этом способе стерилизации погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов.

6.2.7 Перед стерилизацией питательных сред посуду (колбы, бутылки, пробирки) заполняют на половину объема и закрывают ватными пробками, а сверху плотной (пергаментной, крафт) бумагой и обвязывают шпагатом, что позволяет избежать увлажнения пробок водой, сконденсировавшейся на внутренней поверхности крышки автоклава. Нельзя обертывать пробки сосудов целлофаном, фольгой и другими материалами, не пропускающими пар. Длительность и температура стерилизации определяется составом питательной среды, химическим составом материала и целью анализа.

6.2.8 Способы стерилизации питательных сред, посуды, полиэтиленовой пленки и других лабораторных материалов, а также зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от вместимости посуды приведены в приложении Б.

6.3 Приготовление сред и реактивов

6.3.1 Общие требования

6.3.1.1 Питательные среды готовят и стерилизуют в соответствии с требованиями ГОСТ ISO/TS 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.

6.3.1.2 Питательные среды промышленного производства готовят в соответствии с этикеткой или прописью.

Если не указано иное, то готовые среды хранят в сухих, защищенных от прямого солнечного света, помещениях при температуре от 2 °С до 25°С в специальных широкогорлых колбах из термостойкого стекла для стерилизации и хранения питательных сред вместимостью 500 $см^3$ с герметично завинчивающимися крышками, либо в холодильнике в колбах, снабженных ватными пробками, при температуре от 2 °С до 5°С.

6.3.1.3 pH питательных сред доводят до необходимых значений растворами гидроокиси натрия или соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/$дм^3$, измеряя значение pH-метром.

6.3.2 Приготовление сред

6.3.2.1 Приготовление питательного агара

Берут 3 г сухого мясного экстракта, 5 г пептона, 9—18 г сухого питательного агара, высыпают в 1000 $см^3$ дистиллированной, либо водопроводной воды, тщательно перемешивают и кипятят на слабом огне до полного расплавления агара. Устанавливают pH среды 7,0—7,2. Расплавленный раствор стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре (121 ± 1) °С.

Питательный агар из сухого препарата промышленного производства по ГОСТ 17206 готовят в соответствии с этикеткой или следующим способом.

Берут 50 г сухого питательного агара, высыпают в 1000 $см^3$ холодной водопроводной воды, тщательно перемешивают и кипятят на слабом огне в течение 1—2 мин до полного расплавления агара, не допуская пригорания в закрытом сосуде. Устанавливают pH среды 7,0—7,2. Расплавленный раствор фильтруют через вату, разливают в пробирки, флаконы или колбы и стерилизуют в течение 20 мин при температуре (121 ± 1) °С.

Срок хранения готового расплавленного питательного агара — не более 8 ч, готового питательного агара при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 10 сут.

6.3.2.2 Приготовление полужидкого питательного агара

Берут 15 г сухого питательного бульона, 3 г микробиологического агара, растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды при нагревании при температуре 100 °С. Доводят pH до 7,0—7,2, разливают в пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

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

6.3.2.3 Приготовление водного агара

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу по ГОСТ 25336 помещают 1000 $см^3$ дистиллированной воды и вносят 20 г микробиологического агара. Среду стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при температуре 121 °С, давлении 101,3 кПа.

Срок хранения водного агара при температуре от 4 °С от 25 °С — не более 3 мес.

6.3.2.4 Приготовление пептонной воды

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу по ГОСТ 25336 помещают 1000 $см^3$ дистиллированной воды, вносят 10 г пептона и 5 г хлористого натрия, кипятят в течение 15 мин. В горячую жидкость вносят 1,0 г однозамещенного фосфорнокислого калия, 1,0 г двузамещенного фосфорнокислого калия, 0,5 г сернокислого 7-водного магния и 0,5 г хлористого натрия. Доводят pH до 7,5—7,7. Стерилизуют в автоклаве в течение 25 мин при температуре 121 °С и давлении 101,3 кПа.

Срок хранения пептонной воды при температуре от 4 °С от 25 °С — не более 2 мес.

6.3.2.5 Приготовление 0,1 %-ного раствора пептона

К 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, перемешивают и кипятят в течение 5 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки, колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Срок хранения 0,1 %-ного раствора пептона при температуре от 4 °С от 25 °С в условиях, исключающих испарение влаги и нарушение асептики, — не более 2 мес.

6.3.2.6 Приготовление мясопептонного бульона (агара) с глюкозой

К 1000 $см^3$ мясопептонного бульона по ГОСТ 20730 перед стерилизацией добавляют 1 или 10 г глюкозы, устанавливают pH 7,0—7,2 и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 121 °С.

Срок хранения мясопептонного бульона (агара) с глюкозой при температуре от 4 °С от 25 °С — не более 2 мес.

6.3.2.7 Приготовление среды Кесслер-Свенертона

К 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 $см^3$ желчи. Смесь кипятят в течение 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр, добавляют 2,5 г лактозы, доводят объем дистиллированной водой до 1000 $см^3$, устанавливают pH 7,8—8,2, затем добавляют 4 $см^3$ 1 %-ного водного раствора генцианвиолета, разливают в пробирки вместимостью 10 $см^3$ или во флаконы вместимостью 50 $см^3$, стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 15 мин.

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

6.3.2.8 Приготовление лактозного бульона с ТТХ

К 100 $см^3$ мясопептонного бульона добавляют 0,5 г лактозы и после тщательного перемешивания устанавливают pH 6,2—6,4. Среду разливают в пробирки вместимостью 9 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 20 мин. Перед посевом в каждую пробирку с лактозным бульоном прибавляют 0,3 $см^3$ 2 %-ного раствора ТТХ, для приготовления которого к 100 $см^3$ стерильной дистиллированной воды прибавляют 2 г ТТХ.

Срок хранения лактозного бульона с ТТХ в темном месте — не более 2 мес.

6.3.2.9 Приготовление селенитового бульона по Лейфсону

К 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 5 г пептона, 7 г двузамещенного фосфорнокислого безводного натрия, 3 г однозамещенного фосфорнокислого натрия и 4 г лактозы.

Срок хранения селенитового бульона по Лейфсону при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 мес.

6.3.2.10 Приготовление полужидкой среды с глюкозой

К 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 3,0 г микробиологического агара, 10 г пептона, 5 г глюкозы, устанавливают pH 7,4—7,6, разливают в пробирки с поплавками или комочками ваты и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 12 мин.

Срок хранения полужидкой среды с глюкозой — не более 2 мес.

6.3.2.11 Приготовление магниевой среды

Для приготовления магниевой среды используют два раствора.

Для приготовления первого раствора берут 4,2 г пептона, 7,0 г хлористого натрия, 1,5 г однозамещенного фосфорнокислого калия, 10,0 г дрожжевого экстракта и растворяют в 890 $см^3$ дистиллированной воды.

Для приготовления второго раствора берут 36,0 г хлористого магния и растворяют в 90 $см^3$ дистиллированной воды.

Для приготовления магниевой среды смешивают первый и второй растворы и добавляют 50 $см^3$ 0,1 %-ного водного раствора бриллиантовой зелени. Полученную среду стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения магниевой среды — не более 2 мес.

6.3.2.12 Приготовление агара Чепмена

В конической колбе вместимостью 250 $см^3$ смешивают 100 $см^3$ мясопептонного агара, 8,0 г хлористого натрия, 1,0 г маннита, 0,0025 г фенолового красного и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения агара Чепмена — не более 2 мес.

6.3.2.13 Приготовление глюкозо-пептонного бульона

К 1000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия, 5 г глюкозы. Устанавливают pH 7,4—7,6 и разливают в стерильные пробирки с поплавками или комочками ваты. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 12 мин.

Срок хранения глюкозо-пептонного бульона — не более 2 мес.

6.3.2.14 Приготовление среды на индол с триптофаном

Берут 10,0 г сухого панкреатического гидролизата казеина или 100 $см^3$ жидкого панкреатического гидролизата казеина с содержанием аминного азота 500 мг, 5,0 г хлористого натрия, 1,0 г *DL*-триптофана, растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,0, разливают в пробирки вместимостью 5 $см^3$, стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа.

Срок хранения среды на индол с триптофаном — не более 2 мес.

6.3.2.15 Приготовление комбинированной среды по Олькеницкому

Берут 0,2 г сульфата аммоний-железа (II) и 0,3 г тиосульфата натрия и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в колбе вместимостью 50 $см^3$.

Берут 10 г лактозы и 10 г мочевины и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при подогревании на водяной бане.

Берут 25 г питательного сухого агара, расплавляют в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании и помешивании.

Затем подготовленные компоненты соединяют, доводят объем среды до 1000 $см^3$ дистиллированной водой, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2—7,4, добавляют 4 $см^3$ 0,4 %-ного водного раствора фенолового красного и разливают в пробирки вместимостью 6—7 $см^3$.

Полученную среду стерилизуют текучим паром в течение трех дней подряд по 20 мин и скашивают, оставляя столбик высотой 2,0—2,5 см. Готовая среда должна быть прозрачная, иметь красный цвет с коричневым оттенком.

Срок хранения комбинированной среды по Олькеницкому — не более 2 мес.

6.3.2.16 Приготовление среды с лизином

10,0 г *L*-лизина или *L*-лизина монохлорида, 5,0 г пептона, 3,0 г дрожжевого экстракта промышленного производства 1,0 г глюкозы, 0,012 г бромкрезолового пурпурового или 0,6 $см^3$ 1,6 %-ного спиртового раствора бромкрезолового пурпурового растворяют в 1000 $см^3$ кипящей дистиллированной воды, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (6,8 ± 0,1) при температуре 25 °С.

Среду разливают по 5 $см^3$ в узкие бактериологические пробирки вместимостью 15 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при температуре 112 °С и давлении 50,66 кПа в течение 30 мин. Среда должна быть светло-фиолетового цвета.

Готовая среда с лизином хранению не подлежит.

6.3.2.17 Приготовление среды с салицином

10,0 г пептона, 5,0 г хлорида натрия, 10 $см^3$ индикатора Андреде, 2—4 г микробиологического агара растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, устанавливают pH 7,1—7,2 и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 15 мин. К полученной стерильной основе добавляют салицин из расчета 5 г на 1000 $см^3$ основы среды, растворяют и разливают в стерильные пробирки по 3—4 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при температуре 112 °С и давлении 50,66 кПа в течение 30 мин (или дробной стерилизацией текучим паром в течение двух дней по 30 мин).

Срок хранения среды с салицином — не более 2 мес.

6.3.2.18 Приготовление среды Вильсона — Блера

Набор реактивов промышленного производства для приготовления среды Вильсона — Блера состоит из флаконов, содержащих:

- питательную основу (200 $см^3$ мясопептонного агара с 1 %-ной глюкозой);
- 20 %-ный раствор сернистокислого натрия;
- 8 %-ный раствор хлорида железа.

В асептических условиях резиновые пробки флаконов заменяют на стерильные ватно-марлевые. Питательную основу расплавляют на водяной бане, не доводя ее до кипения. В охлажденную до температуры 80 °С расплавленную питательную основу добавляют 20 $см^3$ 20 %-ного раствора сернистокислого натрия, 2 $см^3$ 8 %-ного раствора хлорида железа и тщательно перемешивают.

Среду Вильсона — Блера используют свежеприготовленной.

6.3.2.19 Приготовление сульфит-полимиксин-неомициновой среды по Сидоренко и Пивоварову

К 1000 $см^3$ питательного агара добавляют 10 г глюкозы, 50 $см^3$ 20 %-ного раствора сульфита натрия, 10 $см^3$ 8 %-ного раствора сульфата сернокислого железа (II), 2000000 ЕД полимиксина и 50000 ЕД неомицина. Среду по 9,0 $см^3$ разливают в пробирки вместимостью 15 $см^3$.

Срок хранения сульфит-полимиксин-неомициновой среды при температуре от 4 °С до 6 °С — не более пяти дней.

6.3.3 Приготовление реактивов

6.3.3.1 Приготовление реактивов для окраски препаратов по Граму

Приготовление раствора Люголя

1 г йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора Люголя во флаконе из темного стекла — не более 24 мес.

Приготовление карболового раствора генцианового фиолетового

1 г генцианового фиолетового, 10 $см^3$ этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр.

Карболовый раствор генцианового фиолетового используют свежеприготовленным.

Приготовление кристаллического фиолетового

1 г генциана фиолетового, 10 $см^3$ этилового спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора кристаллического фиолетового — не более 12 мес.

Приготовление насыщенного спиртового раствора основного фуксина

10 г основного фуксина растворяют в 100 $см^3$ этилового спирта.

Срок хранения насыщенного спиртового раствора основного фуксина — не более 12 мес.

Приготовление основного карболового фуксина (фуксин Циля)

1 г основного фуксина, 10 $см^3$ этилового спирта, 54 г фенола растирают в ступке, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения основного карболового фуксина — не более 12 мес.

6.3.3.2 Приготовление реактива для оксидазного теста — 1 %-ного водного раствора тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида

Для приготовления 1 %-ного водного раствора тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида предварительно готовят реактив № 1 и реактив № 2.

Для приготовления реактива № 1 берут 1 г α-нафтола и растворяют в 100 $см^3$ этилового спирта.

Срок хранения реактива № 1 в темном флаконе с притертой пробкой — не более 1 мес.

Для приготовления реактива № 2 берут 1 г фенилендиаминового соединения и растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения реактива № 2 в темном флаконе с притертой пробкой — не более одной недели.

Для приготовления готового раствора к трем частям реактива № 1 добавляют семь частей реактива № 2.

Перед использованием готовый раствор испытывают с тест-культурами микроорганизмов, дающих положительную (*Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*) и отрицательную оксидазную реакцию (*E. coli*).

Готовый раствор используют свежеприготовленным.

6.3.3.3 Приготовление 5 %-ного раствора α-нафтола

5,0 г α-нафтола растворяют в 100 $см^3$ этилового спирта.

Срок хранения 5 %-ного раствора α-нафтола при температуре (4 ± 1) °С — не более 6 мес.

6.3.3.4 Приготовление реактива Эрлиха на индол

Взвешивают 5,0 г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 $см^3$, помещают в коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ и растворяют в 50 $см^3$ этилового спирта. С помощью мерного цилиндра вместимостью 100 $см^3$ медленно добавляют 50 $см^3$ концентрированной соляной кислоты.

Срок хранения реактива Эрлиха в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 6 мес.

6.3.3.5 Приготовление реактива Ковача на индол

Взвешивают 5,0 г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 $см^3$, помещают в коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ и растворяют в 75 $см^3$ изобутилового спирта. С помощью мерного цилиндра вместимостью 100 $см^3$ медленно добавляют 25 $см^3$ концентрированной соляной кислоты.

Срок хранения реактива Ковача в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 6 мес.

6.3.3.6 Приготовление пептонно-буферного раствора

Растворяют 0,45 г дигидрофосфата калия, 5,34 г безводного гидрофосфата натрия и 1 г пептона в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, разливают в пробирки и флаконы и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 50,66 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения пептонно-буферного раствора — не более 6 мес.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Общие требования

Пробы органических удобрений отбирают с соблюдением условий асептики с использованием стерильных инструментов и стерильной посуды.

7.2 Отбор проб

Точечные пробы твердых видов органических удобрений отбирают из разных мест партии и соединяют в объединенную пробу массой не менее 8 кг, тщательно перемешивают и методом квартования сокращают до массы 1 кг. Полученную пробу твердого органического удобрения механически измельчают, тщательно перемешивают и распределяют на ровной поверхности слоем толщиной не более 1 см. Из пяти точек пробы отбирают лабораторную пробу массой 0,5 кг. Лабораторную пробу органического удобрения помещают в полиэтиленовый пакет или склянку, снабжают этикеткой со сведениями об органическом удобрении, датой и местом отбора.

Перед отбором проб бесподстилочный навоз, помет тщательно перемешивают в течение 30 мин, затем пробоотборником с разной глубины отбирают восемь точечных проб объемом не менее 1 $дм^3$. Объединенную пробу помещают в чистое эмалированное ведро, тщательно перемешивают и отбирают лабораторную пробу массой 1 $дм^3$ в стерильную пластиковую или стеклянную банку с пробкой (крышкой). Банки с лабораторной пробой снабжают этикеткой с указанием номера пробы, даты и места отбора, вида органического удобрения, способа и срока его хранения.

Доставленные в лабораторию пробы регистрируют в журнале, в который переносят все сведения, указанные на этикетке.

7.3 Транспортирование и хранение проб

В процессе транспортирования и хранения проб должны быть приняты меры по предупреждению возможности их вторичного загрязнения. Пробы упаковывают в сумки-холодильники и сразу доставляют в лабораторию на анализ. При невозможности проведения анализа в течение одного дня пробы хранят в холодильнике при температуре от 4 °С до 5 °С не более 24 ч. При анализе на наличие бактерий группы кишечные палочки и бактерий рода *Enterococcus* пробы хранят в холодильнике не более трех суток.

8 Проведение анализа

8.1 Общие положения

8.1.1 Приготовление разведений

8.1.1.1 Лабораторную пробу твердых органических удобрений выкладывают на стерильную полиэтиленовую пленку, тщательно перемешивают шпателем, удаляя при этом посторонние включения (камни, стекла и т. д.), разравнивают тонким слоем и из разных мест отбирают 10 г анализируемой пробы. При анализе жидких или полужидких органических удобрений лабораторную пробу тщательно перемешивают и отбирают 10 $см^3$ пробы для анализа.

8.1.1.2 Анализируемую пробу переносят в колбу с 90 $см^3$ стерильной жидкости для разведения. В качестве жидкости для разведения используют стерильную водопроводную воду или физиологический раствор (0,85 %-ный раствор хлористого натрия по ГОСТ 4233).

Параллельно в металлические или стеклянные бюксы отбирают анализируемые пробы для определения влажности по ГОСТ 26713.

Колбы с органическим удобрением помещают на аппарат для встряхивания или гомогенизатор (смеситель) и встряхивают в течение 15 мин, предварительно заменив ватные пробки на резиновые. По окончании встряхивания приступают к проведению анализа, который включает приготовление разведений, проведение посева и учет количества колоний.

8.1.1.3 Разведение осуществляют в ряде пробирок, содержащих по 9 $см^3$ жидкости для разведения, используя постоянный коэффициент разведения, равный 10.

Количество разведений подбирают опытным путем с учетом вида органического удобрения. Колбу с суспензией после встряхивания по 8.1.1.2 оставляют на 30 с для оседания крупных частиц. Стерильной пипеткой отбирают 1 $см^3$ суспензии (не прикасаясь ко дну колбы), переносят ее в пробирку с 9 $см^3$ жидкости для разведения. Суспензию в первой пробирке тщательно перемешивают другой стерильной пипеткой, для чего в пипетку забирают и вновь возвращают в пробирку ее содержимое. Перемешивание суспензии повторяют не менее 10 раз. Затем из первой пробирки аналогичным образом отбирают 1 $см^3$, переносят во вторую пробирку и т. д., таким образом готовят все последующие разведения.

1 $см^3$ суспензии в колбе по 8.1.1.2 соответствует разведению 10^{-1}, в первой пробирке — 10^{-2} и т. д. Пробирки и колбы заранее нумеруют с указанием номера пробы и степени разведения. Схема приготовления разведений и посева суспензии приведена в приложении В.

8.1.1.4 При планировании посева на большое количество питательных сред 9 $см^3$ суспензии будет недостаточно. В этом случае ряд разведений готовят в колбах или бутылях вместимостью 250 $см^3$ с 90 $см^3$ стерильной жидкости для разведения в каждой. Разведения готовят аналогично 8.1.1.3, при этом из первой и последующих колб (бутылей) берут по 10 $см^3$ суспензии, предварительно их встряхивая в течение 1 мин. Использованные пипетки помещают в фарфоровую кружку, на дно которой кладут вату и наливают немного жидкости для разведения.

8.1.2 Посев микроорганизмов

8.1.2.1 Полученную по 8.1.1.3 или 8.1.1.4 суспензию высевают в чашки Петри на плотные питательные среды поверхностным или глубинным способом.

8.1.2.2 Расплавленную и охлажденную до температуры 45 °С — 50 °С агаризованную среду разливают по 15—20 $см^3$ в чашки Петри, находящиеся на горизонтальной поверхности, для получения ровного слоя застывшей среды. После этого чашки Петри помещают в предварительно протертый 70 %-ным этиловым спиртом и нагретый до температуры 65 °С — 70 °С сушильный шкаф на 15—20 мин. По истечении времени в сушильном шкафу чашки Петри переворачивают вверх дном, открывают и ставят под углом 45° на крышку и подсушивают для удаления конденсационной воды до появления «муарового» рисунка на поверхности среды. Развившиеся колонии микроорганизмов на таких чашках не расплываются и не сольются друг с другом.

Тщательно перемешав суспензию в пробирке или колбе (бутылке), стерильной пипеткой на поверхность среды наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,10 $см^3$) соответствующего разведения, затем быстро и тщательно его растирают стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды. Посев осуществляют из двух или трех последовательных разведений в целях проведения более точного подсчета количества микроорганизмов в органическом удобрении. Из каждого разведения засевают по три-пять параллельных чашек. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри переворачивают крышками вниз и инкубируют в термостате при определенной температуре необходимое время.

8.1.2.3 При глубинном посеве 0,5 или 1,0 $см^3$ суспензии из соответствующего разведения переносят стерильной пипеткой в три-пять стерильных чашек Петри, затем заливают расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С — 50 °С средой и перемешивают легким вращательным движением. После застывания среды чашки Петри помещают в термостат.

8.1.2.4 Для микроорганизмов, которые плохо или совсем не развиваются на плотных питательных средах, используют посев в жидкие среды (метод предельных разведений). Этот метод применяют также при определении числа бактерий разных физиологических групп.

В пробирки с жидкой средой вносят по 1 $см^3$ из различных разведений. Посев проводят из каждого разведения или четырех-пяти последних разведений, высевая в три-пять параллельных пробирок. Посев одной анализируемой пробы можно выполнять одной стерильной пипеткой, начиная с большего разведения.

Засеянные пробирки инкубируют в течение трех-десяти суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяют. При этом отмечают плюсом «+» пробирки с разведениями, в которых развились представители определяемой группы микроорганизмов, а минусом «–» — при их отсутствии. В жидких средах о развитии микроорганизмов разных групп судят по помутнению среды, образованию осадка, пленки, пузырьков газа, изменению окраски и т. д.

8.1.3 Учет микроорганизмов

8.1.3.1 После прохождения необходимого срока инкубации чашки Петри вынимают из термостата и подсчитывают число выросших колоний. Для правильного определения числа клеток их подсчитывают только в таких чашках Петри, в которых выросло не менее десяти и не более 250—300 колоний. Закрытые чашки Петри просматривают в проходящем свете и отмечают колонии тушью или маркером по стеклу. Для удобства дно чашки с помощью линейки и маркера делят на секторы. Подсчет колоний на непрозрачных средах (почвенный агар) проводят непосредственно с поверхности. Для подсчета колоний используют специальные полуавтоматические счетчики. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой.

8.1.3.2 Количественные подсчеты на агаризованных средах необходимо проводить через одно и то же время после посева, чтобы получить сравнимые результаты.

Число бактериальных колоний в анализируемом субстрате M, КОЕ/см^3, вычисляют по формуле

$$M = \frac{a\,10^n}{V}, \qquad (1)$$

где a — среднеарифметическое число колоний при посеве данного разведения;

10 — кратность разведения;

n — степень разведения, из которого сделан посев;

V — объем суспензии, взятой для посева по 8.1.2.2—8.1.2.3, см^3.

Полученное число КОЕ соответствует содержанию микроорганизмов в 1 г (см^3) органического удобрения естественной влажности.

Пример

Если для получения разведения взят 1,0 см^3 суспензии и при кратности разведения 10^6 в посеве обнаружено среднеарифметическое число колоний, равное 150, вычисленное число КОЕ будет соответствовать содержанию $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ микроорганизмов в 1 г (см^3) органического удобрения естественной влажности:

$$M = \frac{150 \cdot 10^6}{1,0} = 1,5 \cdot 10^8.$$

Если в чашках не содержится ни одной колонии, то результат выражают следующим образом: «Общее микробное число — менее 10 КОЕ/см^3».

Для пересчета на 1 г абсолютно сухого субстрата необходимо результат, полученный по формуле (1), умножить на коэффициент пересчета, который вычисляют по формуле

$$K = \frac{100}{100 - W}, \qquad (2)$$

где W — влажность органического удобрения, %.

8.1.3.3 Наиболее вероятное количество микроорганизмов *Mprob*, содержащееся в 1 г органического удобрения естественной влажности, при уровне достоверности P = 0,95, вычисляют по формуле

$$Mprob = \overline{X} \pm 2\sigma_{\overline{x}} \cdot R \cdot \frac{1}{V}, \qquad (3)$$

где $\overline{X} = \frac{\sum X}{n}$ — среднеарифметическое число колоний, выросших из данного разведения;

$\sum X$ — общее число подсчитанных колоний при посеве данного разведения;

n — число повторностей;

$\sigma_{\bar{x}} = + \frac{\sqrt{\sum X}}{n}$ — среднеквадратическое отклонение;

2 — критерий (t) при $P = 0,95$;

R — разведение, из которого проведен посев;

V — объем суспензии, взятый для посева по 8.1.2.2—8.1.2.3, см^3.

Если уровень достоверности составляет 99 %, то критерий (t) равен 2,7.

8.1.3.4 Для учета микроорганизмов, посеянных в жидкие среды по 8.1.2.4, используют таблицу Мак-Креди, составленную на основании обработки многочисленных результатов методом вариационной статистики (см. приложение Г).

Для этого необходимо составить числовую характеристику из трех цифр. Первая цифра показывает число параллельно засеянных пробирок (отмечают последнее разведение, в котором рост микроорганизмов наблюдается во всех параллельных пробирках). Следующие две цифры обозначают число пробирок, где еще происходит развитие микроорганизмов в двух последовательных разведениях.

По таблице Мак-Креди находят вероятное число бактериальных клеток, соответствующее числовой характеристике, и умножают на степень разведения, при которой отмечен рост во всех параллельных пробирках. При пересчете на 1 г абсолютно сухого органического удобрения полученный результат умножают на коэффициент, рассчитанный по формуле (2).

Пример

Число параллельных засеянных пробирок равно трем, при этом последнее разведение, в котором наблюдается рост микроорганизмов во всех трех пробирках, равно 10^{-4}. Число пробирок, где еще происходит развитие микроорганизмов, в двух последовательных разведениях равно двум и одной соответственно. Таким образом, числовая характеристика составляет 321.

Разведение	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Число параллельно засеянных пробирок	*3*	*3*	*3*	*3*	*3*
Число пробирок, в которых обнаружен рост	*3*	*3*	*2*	*1*	*0*

В соответствии с таблицей Д.1 находим, что вероятное число клеток равно 15, которое умножаем на 10^{-4}. Если влажность органического удобрения равна 72 %, то вычисленный по формуле (2) коэффициент будет равен 3,57.

Число клеток в 1 г абсолютно сухого органического удобрения равно: $15 \cdot 10^{-4} \cdot 3,57 = 535500$.

8.2 Определение общего микробного числа (ОМЧ) и спорообразующих микроорганизмов

8.2.1 Из каждой анализируемой пробы органических удобрений в зависимости от степени предполагаемого загрязнения используют для посева не менее двух различных разведений с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний.

Суспензию анализируемой пробы органического удобрения в каждом разведении тщательно перемешивают и вносят по 1 см^3 в две стерильные чашки Петри для каждого разведения, слегка приоткрывая крышки. После внесения суспензии в каждую чашку Петри вливают 15—20 см^3 (на чашку диаметром 90—100 мм) расплавленного и остуженного до температуры 45 °С — 49 °С питательного агара после фламбирования края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек Петри, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки Петри. Данную процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

После застывания питательного агара чашки Петри с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Подсчитывают все выросшие на чашке колонии, наблюдаемые под микроскопом при увеличении в два раза. Учитывают только те чашки Петри, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

Если на одной из двух чашек Петри подсчет невозможен, результат определяют на основании учета колоний на одной чашке Петри.

Если на двух чашках Петри имеет место рост расплывчатых колоний, не распространяющийся на всю поверхность чашки Петри, или выросло более 300 изолированных колоний и анализ нельзя повторить, подсчитывают сектор чашки Петри с хорошо дифференцированными, отдельно расположенными колониями с последующим пересчетом на всю поверхность. В этих случаях в протоколе отмечают, что число КОЕ в 1 $см^3$ — ориентировочное.

Если подсчет колоний на чашках Петри невозможен, то в протоколе отмечают: «сплошной рост».

8.2.2 Для обнаружения аэробных спорообразующих микроорганизмов разведения прогревают в течение 30 мин на водяной бане при температуре 65 °С или в течение 15 мин при температуре 80 °С, а затем засевают в МПБ в пробирки или на две-три чашки Петри с МПА. Посевы инкубируют в течение 48 ч при температуре 37 °С. Наличие колоний на МПА (в основном рода *Bacillus*) и помутнение МПБ свидетельствуют о присутствии спор аэробных микроорганизмов.

8.3 Определение патогенных клостридий

8.3.1 Метод основан на выращивании посевов в железо-сульфитном агаре в условиях, приближенных к анаэробным, и подсчете числа выросших черных колоний.

Из каждого разведения (от первого до шестого-восьмого) в два ряда параллельных нестерильных пробирок переносят по 1 $см^3$ суспензии. Один ряд пробирок прогревают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 15 мин или при температуре 90 °С в течение 10 мин. Затем во все пробирки наливают по 9—10 $см^3$ свежеприготовленной среды Вильсона-Блера или сульфит-полимиксин-неомициновую среду для определения *Clostridium perfringens*. Пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками и инкубируют при температуре 37 °С в течение 18—24 ч.

Патогенные клостридии растут в виде черных колоний, часто давая почернение всего столбика среды. Газообразование, особенно при росте *Clostridium perfringens*, приводит к разрывам столбика среды.

Титр патогенных клостридий в органических удобрениях определяют по наибольшему разведению, в котором обнаружены колонии черного цвета и газообразование.

Биохимическую идентификацию клостридий, в случае необходимости, проводят по ГОСТ 31744.

8.4 Определение бактерий группы кишечных палочек

8.4.1 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) основано на высеве суспензии пробы органического удобрения в жидкую селективную среду, содержащую лактозу, для определения сбраживающей способности бактерий по образованию кислоты и газа и, при необходимости, пересева культуральной жидкости на поверхность плотных специальных агаризованных сред для подтверждения принадлежности по культуральным и биохимическим признакам выделенных колоний к колиформным бактериям.

Определение коли-титра (коли-индекса) проводят с использованием жидких селективных сред Кесслера-Свенертона, глюкозо-пептонного или лактозного бульона с ТТХ с последующей их идентификацией.

8.4.2 Из первого разведения пробы органических удобрений (1:10) стерильной пипеткой берут 10 $см^3$ суспензии и засевают во флаконы вместимостью 100 $см^3$ с 50 $см^3$ жидкой селективной среды, что соответствует посеву 1 г. Посев меньших количеств органического удобрения (0,1; 0,01; 0,001 и т. д.) осуществляют по 1 $см^3$ из соответствующих разведений в стерильные пробирки вместимостью 15 $см^3$ с 8—10 $см^3$ жидкой селективной среды.

Посевы на среде Кесслера-Свенертона инкубируют в течение 48 ч при температуре 37 °С или 43 °С. О наличии бактерий группы кишечных палочек судят по газообразованию и помутнению среды.

При появлении более чем через 48 ч газообразования и помутнения или только помутнения среды Кесслер-Свенертона проводят посев на среду Эндо, или среду Левина, или розоловый агар. Для этого из флаконов, где отмечено изменение среды, культуральную жидкость петлей высевают штрихами на поверхность среды, разлитой в чашки Петри и разделенной на три-четыре сектора. Чашки с посевом помещают в термостат на 24 ч при температуре 37 °С.

По отсутствию роста на среде в чашках Петри дают окончательное заключение об отсутствии БГКП.

Типичными для БГКП являются красные и/или розовые колонии с металлическим блеском или без него — на среде Эндо; желтые или оранжевые — на розоловом агаре; черные с металлическим блеском, темные с черным центром, сиреневые с темным центром — на среде Левина.

8.4.3 При анализе пробы органического удобрения с предполагаемой высокой степенью загрязнения бактериями кишечной палочки допускается проводить прямой поверхностный посев разведений на среду Эндо в количестве 0,10 или 0,05 $см^3$ обычным способом. Для этого среду Эндо заранее разливают в чашки Петри и подсушивают в сушильном шкафу до «муаровой» пленки. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч.

8.4.4 Для идентификации выросших на агаризованных средах характерных колоний готовят из них мазки и сначала окрашивают по Граму, затем исследуют на присутствие оксидазы и способность ферментировать лактозу. Если оксидазный тест оказался положительным, то на способность ферментировать лактозу колонии не исследуют.

8.4.4.1 БГКП являются грамотрицательными палочками, поэтому при окраске по Граму не окрашиваются и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином или сафранином они приобретают розовую окраску.

На обезжиренное этиловым спиртом предметное стекло наносят петлей одну каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии, полученной по 8.4.2—8.4.3, и распределяют по всей поверхности. Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки. Затем на полученный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на 0,5—1,0 мин, снимают бумагу, наливают раствор Люголя на 0,5—1,0 мин, сливают раствор Люголя и промывают стекло в этиловом спирте в течение 0,5—1,0 мин, пока не смоется весь краситель. Затем стекло тщательно промывают дистиллированной водой и докрашивают в течение 1—2 мин фуксином Циля, разведенным в соотношении 1:10 с дистиллированной водой. После промывания дистиллированной водой и просушивания препарата при комнатной температуре в течение пяти минут полученный мазок микроскопируют.

8.4.4.2 Для постановки оксидазного теста полоску фильтровальной бумаги помещают в чистую чашку Петри и смачивают двумя-тремя каплями реактива для оксидазного теста. Готовую бумажную систему для оксидазного теста (СИБ-оксидазу) смачивают дистиллированной водой.

Часть изолированной колонии, полученной по 8.4.2—8.4.3, стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу.

Бактерии группы кишечной палочки — оксидазоотрицательные микроорганизмы. Реакция считается положительной, если в течение 1 мин появляется фиолетово-коричневое окрашивание штриха при использовании реактива для оксидазного теста или синее — при использовании СИБ-оксидазы. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

Если при исследовании колоний, окрашенных в темно-красный цвет, получают недостаточно четкий результат, необходимо пересеять культуру со среды Эндо на питательный агар. После инкубации оксидазный тест повторяют.

8.4.4.3 Оставшуюся часть колонии, полученной по 8.4.2—8.4.3, после окраски по Граму и отрицательного результата оксидазного теста засевают параллельно в две пробирки с полужидкой средой, содержащей лактозу. Посев проводят уколом до дна пробирки и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч. Готовую бумажную систему для лактозного теста (СИБ-лактозу) смачивают дистиллированной водой.

Часть изолированной колонии, полученной по 8.4.2—8.4.3, стеклянной палочкой или платиновой петлей (металлическая петля из нихрома может дать ложноположительную реакцию) наносят штрихом на подготовленную фильтровальную бумагу.

Бактерии группы кишечных палочек способны ферментировать лактозу с образованием кислоты и газа. При образовании кислоты цвет питательной среды изменяется. При газообразовании газ скапливается или по уколу, или на поверхности, или в толще среды появляются разрывы. Первичный учет образования кислоты и газа на полужидкой среде с лактозой или СИБ-лактозе возможен через 4—6 ч.

При инкубации посевов более 5 ч газ может улетучиться. В таких случаях на присутствие газа указывают оставшиеся в толще среды «карманы» — потемнения среды на месте бывшего пузырька газа.

При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами для окончательного учета БГКП после просмотра через 24 ч и получения отрицательного результата оставляют для окончательного учета до 48 ч.

Если колония, подлежащая исследованию, незначительных размеров, ее пересевают на скошенный питательный агар и после инкубации в течение 18—24 ч выполняют все необходимые подтверждающие тесты.

8.5 Определение бактерий рода *Salmonella* (сальмонелл)

8.5.1 Метод выявления наличия сальмонелл в органических удобрениях основан на высеве микробной суспензии органического удобрения в жидкую неселективную среду, инкубировании посевов, последующем накоплении бактерий в жидких селективных средах, выявлении бактерий, образующих типичные колонии на агаризованных дифференциально-диагностических средах, имеющих типичные для бактерий рода *Salmonella* биохимические и серологические характеристики.

8.5.2 Из лабораторной пробы органического удобрения отбирают 55,5 г, добавляют 500 $см^3$ стерильной неселективной среды обогащения — пептонной воды. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Одновременно делают посев материала из указанной среды до ее инкубирования на дифференциально-диагностические среды — висмут-сульфит агар. Инкубируют посевы при температуре 37 °С в течение 48 ч.

После инкубирования посевов на неселективной среде обогащения проводят посев материала в магниевую среду обогащения из расчета 1 $см^3$ надосадочной жидкости на 10 $см^3$ магниевой среды.

Следует учитывать, что магниевая среда угнетает рост сальмонелл тифа, поэтому при подозрении на их наличие магниевую среду заменяют на селенитовый бульон, а висмут-сульфит агар — на среду Плоскирева или среду Эндо.

Суспензию с магниевой средой инкубируют в течение 18—20 ч при температуре 37 °С.

Материал, прошедший инкубацию в магниевой среде, высевают на чашки Петри с дифференциально-диагностическими средами — висмут-сульфит агаром, средой Эндо, средой Плоскирева и средой Левина. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24—48 ч.

После инкубирования посевов на дифференциально-диагностических средах отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Salmonella*:

- на висмут-сульфит агаре — черные колонии с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колонией;
- среде Эндо — круглые бесцветные или слегка розоватые прозрачные колонии;
- среде Плоскирева — бесцветные прозрачные колонии, но более плотные, чем на среде Эндо;
- среде Левина — прозрачные, светло-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

При отсутствии в посевах на дифференциально-диагностических средах характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний дают заключение об их отсутствии в анализируемой пробе. При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний проводят их дальнейшую идентификацию по 8.5.3.

8.5.3 Идентификация сальмонелл

8.5.3.1 Не менее трех типичных колоний с каждой дифференциально-диагностической среды (в случае наличия одной-двух типичных колоний — каждую из них) пересевают на скошенную поверхность МПА и среду из сухого питательного агара. Часть этих колоний пересевают штрихом по поверхности и уколом в столбик TSI-агара. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч и проводят идентификацию сальмонелл в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Идентификация сальмонелл

Идентификационные показатели	Питательные среды, реактивы	Реакция сальмонелл
Окраска по Граму	Генциановый карболовый или кристаллический фиолетовый, раствор Люголя, этиловый спирт, фуксин	Грамотрицательны
Наличие активной оксидазы	СИБ-оксидаза, тетраметил-п-фенилендиамин гидрохлорид, фенкпендиаминовое соединение	Оксидазоотрицательны
Ферментация лактозы	СИБ-лактоза, трехсахарный агар (TSI-агар), агар Олькеницкого или агар Клиглера	Лактозоотрицательны
Ферментация глюкозы с образованием кислоты или кислоты и газа	Трехсахарный агар (TSI-агар) или агар Олькеницкого, или агар Клиглера, среда Гисса с глюкозой, столбики трехсахарного агара (TSI-агара)	Глюкозоположительны
Способность образовывать сероводород	Трехсахарный агар (TSI-агар), агар Олькеницкого	Образуют сероводород

Окончание таблицы 1

Идентификационные показатели	Питательные среды, реактивы	Реакция сальмонелл
Способность расщеплять мочевину	Агар Кристенсена с мочевиной	Мочевиноотрицательны
Ферментация маннита	Среда Гисса с маннитом	Маннитположительны
Ферментация сахарозы	Трехсахарный агар (TSI-агар) или агар Олькеницкого, или среда Гисса с сахарозой	Сахарозоотрицательны
Ферментация салицина	Полужидкая среда, содержащая пептон, хлористый натрий, индикатор Андреде, питательный агар, салицин	Салицинотрицательны
Образование ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра)	МПБ с глюкозой, α-нафтол, гидроксид калия	Ацетоинотрицательны
Образование индола	1 %-ная пептонная вода или среда на индол с триптофаном, реактив Эрлиха, реактив Ковача	Индолотрицательны
Декарбоксилирование лизина	Жидкая лизиновая среда для декарбоксилирования лизина	Лизинположительны
Подвижность	Полужидкий МПА	90 % подвижны

Для идентификации сальмонелл сначала проводят окраску по Граму, затем определяют наличие активной оксидазы, ферментацию лактозы и определение ферментации глюкозы с образованием кислоты и газа и способность образовывать сероводород.

У культур, отобранных и пересеянных предварительно на поверхность МПА по 8.5.3.1, изучают возможность расщепления мочевины, ферментации маннита, сахарозы, салицина, образования ацетоина и индола, декарбоксилирования лизина и подвижность.

Дальнейшему изучению также подвергают лактозоположительные бактерии или бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

8.5.3.2 Окраска по Граму

Окраску по Граму проводят аналогично 8.4.4.1. Бактерии рода *Salmonella* являются бесспоровыми грамотрицательными палочками с закругленными концами.

8.5.3.3 Наличие активной оксидазы

Наличие активной оксидазы определяют аналогично 8.4.4.2.

8.5.3.4 Ферментация лактозы

Определение способности ферментировать лактозу проводят по 8.4.4.3.

8.5.3.5 Определение ферментации глюкозы с образованием кислоты и газа и способности образовывать сероводород

Способность ферментировать глюкозу определяют на TSI-агаре. Пожелтение скошенной части среды указывает на ферментацию лактозы или сахарозы или обоих сахаров; пожелтение столбика среды с разрывом агара или пузырьками газа указывает на ферментацию глюкозы с образованием кислоты и газа, пожелтение столбика среды без разрывов или пузырьков газа указывает на ферментацию глюкозы до кислоты без образования газа. Почернение среды в столбике указывает на образование сероводорода.

Типичными для бактерий рода *Salmonella* являются культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, образующие сероводород.

8.5.3.6 Определение расщепления мочевины

Часть бактериальной колонии, выбранной для идентификации, пересевают штрихом на поверхность агара Кристенсена с мочевиной. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

При положительной реакции — расщеплении мочевин — цвет среды должен быть от розового до светло-вишневого. Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования.

Бактрии рода *Salmonella* не расщепляют мочевину.

8.5.3.7 Способность ферментации маннита и сахарозы

Часть бактериальной колонии, выбранной для идентификации, пересевают в среды Гисса с маннитом и сахарозой. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Бактерии рода *Salmonella* не ферментируют сахарозу, но ферментируют маннит. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

8.5.3.8 Способность ферментации салицина

Часть бактериальной колонии, выбранной для идентификации, пересевают в среду Гисса с салицином. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Бактерии рода *Salmonella* не ферментируют салицин.

8.5.3.9 Образование ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра)

Культуры пересевают в МПБ с глюкозой. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубирования к 1 $см^3$ культуральной жидкости добавляют 0,6 $см^3$ раствора α-нафтола и 0,2 $см^3$ раствора гидроокиси калия концентрации 400 г/$см^3$. После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление ярко-красного окрашивания не позднее чем через 15 мин указывает на положительную реакцию образования ацетоина.

Бактерии рода *Salmonella* ацетоин не образуют (реакция Фогес-Проскауэра отрицательная).

8.5.3.10 Определение образования индола

При исследовании на индол из колонии микроорганизмы высевают в пробирки с 1 %-ной пептонной водой или среду на индол с триптофаном и термостатируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. Затем в пробирку с суточной культурой по стенке добавляют 5—10 капель реактива Эрлиха. При наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо, при отсутствии — кольцо остается светло-желтого цвета.

Для определения индолообразования также используют реактив Ковача. Для этого к суточной культуре вместо реактива Эрлиха добавляют 0,2—0,3 $см^3$ реактива Ковача и взбалтывают. Результат учитывают через 10 мин — реактив поднимается на поверхность среды и при наличии индола окрашивается в темно-красный цвет.

Бактерии рода *Salmonella* индола не образуют.

8.5.3.11 Декарбоксилирование лизина

Культуру высевают на поверхность жидкой лизиновой среды для декарбоксилирования. Посевы инкубируют в термостате при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Появление темно-красной или фиолетовой окраски свидетельствует о декарбоксилировании лизина (положительная реакция), желтая окраска среды — об отрицательной.

Бактерии рода *Salmonella* дают положительную реакцию.

8.5.3.12 Определение подвижности

Культуры пересевают уколом в полужидкий мясопептонный агар. Посевы инкубируют в термостате при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. При росте подвижных культур отмечается диффузный рост по всему столбику агара, при росте неподвижных культур — вдоль места укола.

Большинство штаммов бактерий рода *Salmonella* подвижны.

8.5.4 Расчет индекса сальмонелл в органических удобрениях

При наличии положительного результата прямого посева суспензии на висмут-сульфит агар высчитывают среднеарифметическое число выросших колоний в 0,1 $см^3$, что соответствует количественному содержанию (индексу) сальмонелл в органическом удобрении.

Прямой посев суспензии может быть заменен растиранием 0,1—0,5 г органического удобрения на поверхности висмут-сульфит агара. Количество выросших колоний сальмонелл пересчитывают на 1 г органического удобрения.

8.6 Определение бактерий рода *Staphylococcus* (стафилококков)

8.6.1 Для идентификации стафилококков из первого разведения по 8.1.1 отбирают 2 $см^3$ суспензии и вносят в солевой МПБ с 6,5 %-ным хлоридом натрия в соотношении 1:5 и инкубируют посевы в термостате в течение 24—48 ч при температуре 37 °С.

8.6.2 Из пробирок, в которых обнаружен рост бактерий, т. е. наблюдалось диффузное помутнение с последующим выпадением осадка или на поверхности бульона образовалась пленка, делают пересев на агар Чепмена в чашках Петри. Посевы инкубируют аналогично 8.4.6.1. Из характерных круглых, выпуклых и окрашенных (белые, лимонные, оранжевые) колоний с агара Чепмена готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

Приложение А
(справочное)

Дезинфицирующие растворы

А.1 В качестве дезинфицирующих растворов используют 2—3 %-ный раствор бикарбоната натрия, 3—5 %-ный раствор фенола, 0,5—3,0 %-ный раствор хлорамина, а также 1—6 %-ный раствор перекиси водорода в смеси с моющими средствами и водопроводной водой в соответствии с таблицей А.1.

Таблица А.1

Наименование микроорганизмов, подлежащих дезинфекции раствором	Температура раствора, °С	Содержание в растворе, %		Соотношение компонентов для приготовления 10 дм^3 раствора		
		перекиси водорода	моющего средства	перекиси водорода, см^3	водопроводной воды, см^3	моющего средства, г
Споровые формы	20	6	0,5	2400	7550	50
	30—40	3	0,5	1200	8750	50
Плесневые грибы	20	4	0,5	1600	8350	50
	30—40	2	0,5	800	9150	50
Вегетативные формы	20	3	0,5	1200	8750	50
	30—40	1	0,5	400	9550	50

Приложение Б
(справочное)

Способы и продолжительность стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

Б.1 Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Наименование стерилизуемого материала	Метод стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
Питательные среды с почвенной вытяжкой, картофельные среды	Автоклавирование	Давление 151,95—202,6 кПа в течение 30 мин	В колбах, пробирках, бутылях и т. д., закрытых ватными пробками
Жидкие и агаризованные среды, не содержащие сахаров и других веществ, разлагающихся при температуре 120 °С	То же	Давление 101,3 кПа в течение 20 мин	То же
Жидкие и агаризованные среды с сахарами и другими соединениями, не выдерживающими нагревание до температуры более 120 °С	»	Давление 50,7 кПа в течение 15—30 мин	»
Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания до температуры более 100 °С	Дробная стерилизация	Текучий пар, три раза по 30—40 мин через одни сутки	»
Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания (белки, витамины, аминокислоты)	Фильтрование через бактериальные фильтры	—	—
Вазелиновое масло, глицерин, тальк	Горячим воздухом	При температуре 160 °С в течение 2 ч или при температуре 170 °С в течение 1 ч	Слой вещества не должен превышать 1,5 см
Водопроводная вода			
Чашки Петри, пипетки, шпатели, колбы, пробирки, химические стаканы, флаконы, стеклянные центрифужные пробирки	То же	При температуре 160 °С — 170 °С в течение 2 ч	Завернуты в бумагу, отверстия пипеток закрыты ватными тампонами, другие сосуды закрыты ватными пробками
Мембранные фильтры	Авто-клавирование	Давление 101,3 кПа в течение 15 мин	В сосуде с дистиллированной водой
Стеклянные фильтры, резиновые пробки и трубки	То же	Давление 101,3 кПа в течение 20 мин	В бумажной упаковке
Полиэтиленовые пленки	Химический	Погружение в 6 %-ный раствор перекиси водорода на 3—6 ч с последующим промыванием стерильной водопроводной водой	

Б.2 Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от вместимости посуды приведена в таблице Б.2.

Таблица Б.2

Наименование емкости	Вместимость, $см^3$	Время стерилизации при температуре 121 °С — 123 °С, мин
Пробирки	35	12—14
	150	13—17
	210	15—20
Колбы тонкостенные	50	12—14
	125	12—14
	200	12—15
	500	17—22
	900	19—24
	1000	20—25
	1800	25—30
	2000	30—35
Колбы толстостенные	500	24—28
	1000	25—30
	2000	40—45
Матрасы	1000	30—35
Бутыли	200	15—20
	9000	50—55

Приложение В
(справочное)

Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

В.1 Схема приготовления разведений и посева суспензии приведена на рисунке В.1.

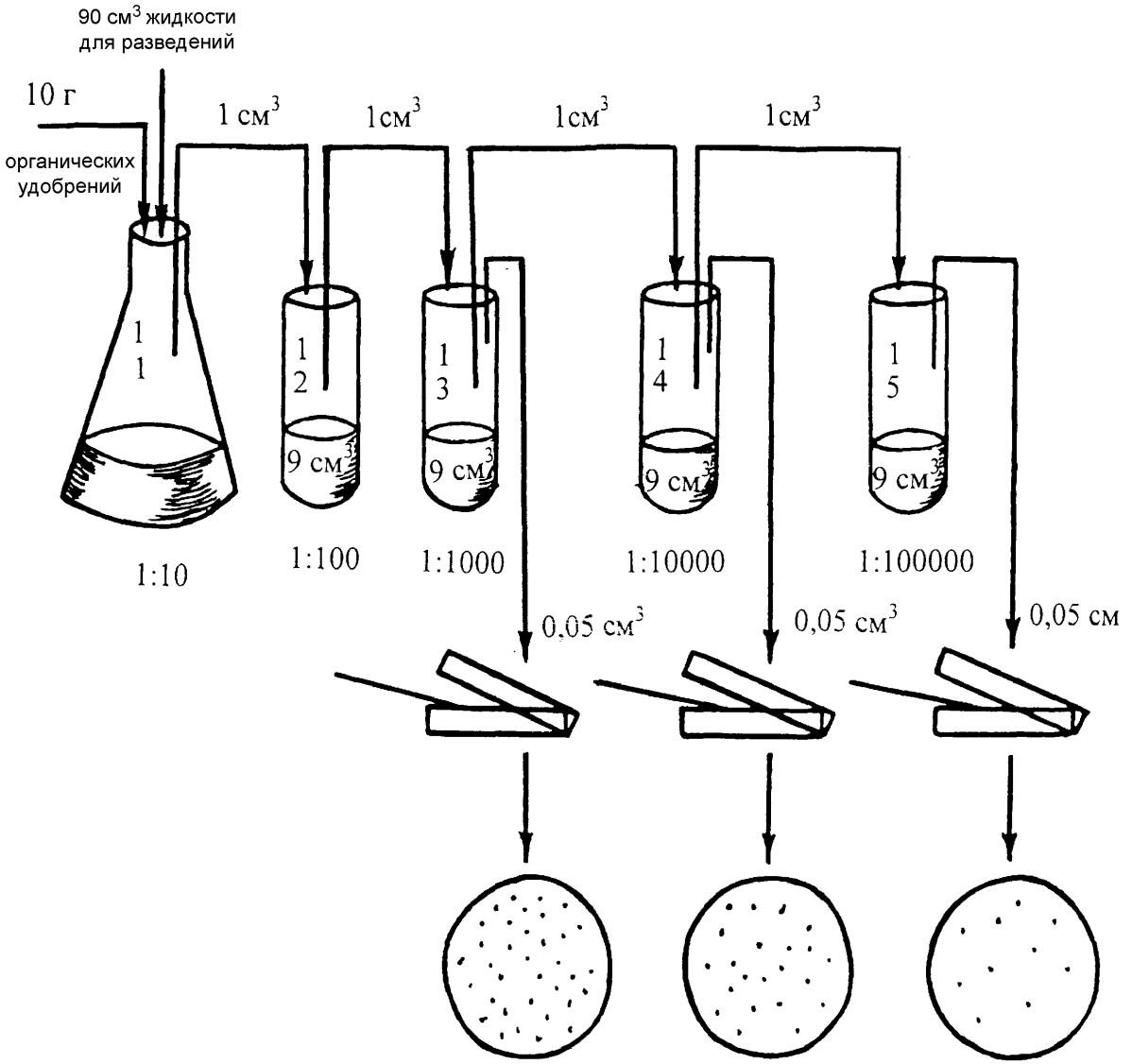


Рисунок В.1

Приложение Г
(справочное)

Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди)

Г.1 Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди) в соответствии с 8.1.3.4 приведена в таблице Г.1.

Таблица Г.1

Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок		
	3	4	5		3	4	5
300	2,5	1,1	0,8	414	—	14,0	—
301	4,0	1,6	1,1	420	—	6,0	2,0
302	6,5	2,0	1,4	421	—	9,5	2,5
303	—	2,5	—	422	—	13,0	3,0
310	4,5	1,6	1,1	423	—	17,0	—
311	7,5	2,0	1,4	424	—	20,0	—
312	11,5	3,0	1,7	430	—	11,5	2,5
313	16,0	3,5	2,0	431	—	16,5	3,0
320	9,5	2,0	1,4	432	—	20,0	4,0
321	15,0	3,0	1,7	433	—	30,0	—
322	20,0	3,5	2,0	434	—	35,0	—
330	25,0	3,0	1,7	440	—	25,0	3,5
331	45,0	3,5	2,0	441	—	40,0	4,0
332	110,0	4,0	—	442	—	70,0	—
333	140,0	5,0	—	443	—	140,0	—
340	—	3,5	2,0	444	—	160,0	—
341	—	4,5	2,5	450	—	—	4,0
350	—	—	2,5	451	—	—	5,0
400	—	2,5	1,3	500	—	—	2,5
401	—	3,5	1,7	501	—	—	3,0
402	—	5,0	2,0	502	—	—	4,0
403	—	7,0	2,5	503	—	—	6,0
410	—	3,5	1,7	504	—	—	7,5
411	—	5,5	2,0	510	—	—	3,5
412	—	8,0	2,5	511	—	—	4,5
413	—	11,0	—	512	—	—	6,0

Окончание таблицы Г.1

Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок		
	3	4	5		3	4	5
513	—	—	8,5	540	—	—	13,0
520	—	—	5,0	541	—	—	17,0
521	—	—	7,0	542	—	—	25,0
522	—	—	9,5	543	—	—	30,0
523	—	—	12,0	544	—	—	35,0
524	—	—	15,0	545	—	—	45,0
525	—	—	17,5	550	—	—	25,0
530	—	—	8,0	551	—	—	35,0
531	—	—	11,0	552	—	—	60,0
532	—	—	14,0	553	—	—	90,0
533	—	—	17,5	554	—	—	100,0
534	—	—	20,0	555	—	—	180,0
535	—	—	25,0	—	—	—	—

УДК 631.86.354 МКС 65.080

Ключевые слова: органические удобрения, методы определения наличия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, отбор проб, подготовка проб, питательные среды, разведение, посев, учет патогенных и условно-патогенных патогенных микроорганизмов

Редактор *И.А. Королева*
Корректор *М.Ж. Будажапова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Тираж 36 экз. Зак. 343.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru