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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 10444.11 — 2013 (ISO 15214:1998)

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

(ISO 15214:1998, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

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 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательский институтом консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 58–П от 28 августа 2013 г.)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 oC» (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета мезофильных молочнокислых бактерий. Метод подсчета колоний при температуре 30 0С).

Международный стандарт разработан подкомитетом ISO/TC 34/SC 9 «Microbiology» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Food products» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Степень соответствия – модифицированная (MOD)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1744-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 10444.11-2013 (ISO 15214:1998) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2015 г.

6 ВЗАМЕН ГОСТ 10444.11-89

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, 2014

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

Microbiology of food and animal feeding stuffs.
Methods for detection and enumeration of mesophilic lactic acid bacteria

Дата введения — 2015—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и корма для животных и устанавливает метод выявления мезофильных молочнокислых микроорганизмов и методы подсчета их количества:

- метод наиболее вероятного числа (НВЧ);
- методы посева в или на плотные среды.

Метод наиболее вероятного числа предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не более 150 или в 1 $см^3$ жидкого продукта не более 15 клеток молочнокислых микроорганизмов.

Метод посева в агаризованные питательные среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 150 или в 1 $см^3$ жидкого продукта не менее 15 колониеобразующих единиц (КОЕ) молочнокислых микроорганизмов.

Метод посева на агаризованные питательные среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 1500 или в 1 $см^3$ жидкого продукта не менее 150 КОЕ молочнокислых микроорганизмов.

Методы применимы также для выяснения причин возникновения порчи пищевых продуктов и для испытания проб окружающей среды, отобранных из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

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

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

ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670–91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 29228–91 (ИСО 835-2–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 30425–97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности

Издание официальное

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 следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 молочнокислые микроорганизмы : Микроорганизмы из родов Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus.

3.2 мезофильные молочнокислые микроорганизмы: Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии в или на плотных питательных средах или проявляют характерные признаки роста в жидких средах при температуре инкубирования посевов 30–37 °С, и которые дают характерные реакции при подтверждении в условиях, устанавливаемых в настоящем стандарте.

4 Сущность методов

Методы выявления и определения количества молочнокислых микроорганизмов основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведения в жидкие, в или на плотные питательные среды, культивировании посевов в оптимальных для роста условиях и, при необходимости, подсчета их количества и определения морфологических и биохимических свойств.

5 Растворы для разведений, питательные среды, растворы реактивов

5.1 Растворы для разведений

Растворы для разведений – по [1]–[4] и ГОСТ 26669 или любому другому стандарту, касающемуся исследуемого продукта.

5.2 Питательные среды, растворы реактивов

5.2.1 Среда MRS

5.2.1.1 Состав

Ферментативный перевар казеина, г	10,0
Мясной экстракт, г	10,0
Дрожжевой экстракт, г	4,0
Триаммоний цитрат [(NH4)3C6H5O7], г	2,0
Натрия ацетат (CH3COONa), г	5,0
Магния сульфат (MgSO4•7H2O), г	0,2
Марганца сульфат (MnSO4•4H2O), г	0,05
Калия гидрофосфат (K2HPO4), г	2,0
Глюкоза (C6H12O6), г	20,0
Полиоксиэтиленсорбитан (Tween 80), г	1,08
Агар	от 12 до 18,0 а)
Вода, $см^3$	1000 б)
а) в зависимости от желирующих свойств;	
б) для приготовления питательных сред и реактивов используют дистиллированную воду по ГОСТ 6709.	

5.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде при нагревании. С помощью pH-метра (см. 6.5) устанавливают pH, так чтобы после стерилизации он составлял (5,7 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 ^{0}С.

Переносят среду в сосуды соответствующей вместимости и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Если среду необходимо использовать немедленно, то ее охлаждают до температуры приблизительно 47 °С на водяной бане (см. 6.4) или любым другим способом, дающим аналогичные результаты.

Если среда не будет использоваться сразу, то перед началом микробиологических исследований среду полностью расплавляют на кипящей водяной бане, а затем охлаждают до температуры приблизительно 47 °С на водяной бане (см. 6.4).

Если предполагается значительное содержание дрожжей в испытуемом продукте (например, в сухой колбасе), то добавляют сорбиновую кислоту в агар MRS. Для этого растворяют 1,4 г сорбиновой кислоты приблизительно в 10 $см^3$ раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$. Раствор стерилизуют фильтрованием. Добавляют этот раствор в 1000 $см^3$ стерилизованного агара MRS, предварительно охлажденного до температуры приблизительно 47 °С. Конечное значение pH среды должно быть (5,7 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С.

5.3 Среда Бликфельдта плотная

5.3.1 Состав

Пептон, г	5,0
Лактоза, г	10,0
Глюкоза, г	10,0
Экстракт дрожжевой, г	10,0
Кальций углекислый, г	5,0
Агар	от 12 до 18,0а)
Вода, $см^3$	1000
а) в зависимости от желирующих свойств.	

5.3.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде при нагревании. С помощью pH-метра (см. 6.5) устанавливают pH, так чтобы после стерилизации он составлял (7,3 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С.

Переносят среду в сосуды соответствующей вместимости и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (117 ± 1) °С не более 15 мин.

Перед разливкой по чашкам Петри среду осторожно перемешивают, чтобы углекислый кальций распределился равномерно.

5.4 Жидкая среда Бликфельдта

5.4.1 Состав

Пептон, г	5,0
Лактоза, г	10,0
Глюкоза, г	10,0
Экстракт дрожжевой, г	10,0
Раствор бромкрезолового пурпурного, $см^3$ (по 5.4.3)	10,0
Вода, $см^3$	1000

5.4.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде при нагревании. С помощью pH-метра (см. 6.5) устанавливают pH, так чтобы после стерилизации он составлял (7,3 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С.

Разливают среду в пробирки и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (117 ± 1) °С не более 15 мин.

5.4.3 Раствор бромкрезолового пурпурного

5.4.3.1 Состав

Бромкрезоловый пурпурный, г	0,1
Вода, $см^3$	100,0

5.4.3.2 Приготовление

Бромкрезоловый пурпурный, смывая стерильной дистиллированной водой переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем этой же водой до метки. Раствор хранят не более 3 мес при комнатной температуре.

5.5 Среда Ли

5.5.1 Состав

Гидролизат казеина, г	10,0
Экстракт дрожжевой, г	10,0
Лактоза, г	5,0
Сахароза, г	5,0
Углекислый кальций, г	3,0
Калий гидрофосфат, г	0,5
Бромкрезоловый пурпурный, $см^3$ (по 5.4.3)	20,0
Агар	от 12 до 18,0[a)]
Вода, $см^3$	1000
а) в зависимости от желирующих свойств.	

5.5.2 Приготовление

Растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде при нагревании. С помощью pH-метра (см. 6.5) устанавливают pH, так чтобы после стерилизации он составлял (7,0 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С.

Переносят среду в сосуды соответствующей вместимости и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Перед разливкой по чашкам Петри среду осторожно перемешивают, чтобы углекислый кальций распределился равномерно.

5.6 Среда для определения псевдокаталазы

5.6.1 Состав

Пептон, г	5,0
Экстракт дрожжевой, см3	25,0
Твин 80, $см^3$	0,5
$MnSO4·4H2O$, г	0,1
Глюкоза, г	0,5
Агар, г	от 15,0 до 18,0[a)]
Вода, $см^3$	1000,0
а) в зависимости от желиру ющих свойств.	

5.6.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде при нагревании на водяной бане. С помощью pH-метра (см. 6.5) устанавливают pH, так чтобы после стерилизации он составлял (6,9 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С.

Разливают среду в пробирки по 5 –7 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

После стерилизации пробирки помещают на наклонную поверхность для получения скошенной поверхности среды.

5.7 Мясо-пептонный бульон с pH = 9,6

5.7.1 Состав

Мясо-пептонный бульон – по ГОСТ 10444.1.

5.7.2 Приготовление

Устанавливают pH мясо-пептонного бульона, так чтобы после стерилизации он составлял (9,6 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С.

Разливают среду в пробирки по 5-7 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

5.8 Мясо-пептонный бульон с 6,5 % NaCl

5.8.1 Состав

Мясо-пептонный бульон по ГОСТ 10444.1, $см^3$	100,0
NaCl, г	60,0

5.8.2 Приготовление

Растворяют при нагревании хлористый натрий в мясо-пептонном бульоне. Разливают среду в пробирки по 5–7 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве (см. 6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

5.9 Раствор нигрозина

5.9.1 Состав

Нигрозин, г	10,0
Вода, $см^3$	100,0

5.9.2 Приготовление

Нигрозин переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, смывая дистиллированной водой, объем доводят до метки, нагревают до температуры 45–50 °С на водяной бане, затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

5.10 Реактив для определения цитохромов

5.10.1 Состав

Бензидин основной или солянокислый, г	1,0
Кислота уксусная ледяная 99,8 %, $см^3$	20,0
Спирт этиловый 96 %, $см^3$	50,0
Вода, $см^3$	30,0

5.10.2 Приготовление

Бензидин растворяют в ледяной уксусной кислоте, добавляют дистиллированную воду и медленно нагревают, после охлаждения в раствор вносят этиловый спирт. Раствор хранят в холодильнике в течение 1 мес.

5.11 Раствор карболфуксина

5.11.1 Состав

Фуксин, г	1,0
Спирт этиловый 96 %, $см^3$	10,0
Раствор фенола массовой концентрацией 50 $г/дм^3$, $см^3$	100,0

5.11.2 Приготовление

Карболфуксин смешивают с этиловым спиртом и раствором фенола.

Для приготовления рабочего раствора карболфуксина к 10 $см^3$ концентрированного раствора карболфуксина добавляют 90 $см^3$ дистиллированной воды.

5.12 Допускается использование готовых и дегидратированных питательных сред, в т.ч. хромогенных, и их компонентов по качеству не уступающих вышеуказанным.

Приготовление и применение питательных сред – в соответствии с требованиями нормативных документов стран, принявших стандарт.

6 Оборудование и лабораторная посуда

Приемлемой альтернативой посуды многоразового применения является одноразовая посуда, если она отвечает соответствующим требованиям. Одноразовая посуда предпочтительнее многоразовой.

Применяют микробиологическое лабораторное оборудование по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ 10444.1:

6.1 Оборудование для сухой стерилизации (сушильный шкаф) или стерилизации паром (автоклавы).

6.2 Сушильный шкаф или инкубатор, с конвекционной вентиляцией, для сушки агаровых пластин, поддерживающий температуру от (37 ± 1) °С до (55 ± 1) °С.

6.3 Инкубаторы (термостаты), поддерживающие температуру (30 ± 1) °С или (37 ± 1) °С.

6.4 Бани водяные, поддерживающие температуру от 44 ° С до 47 °С.

6.5 pH-метр, с точностью ± 0,1 ед. pH при температуре 25 °С.

6.6 Чашки Петри, стеклянные или пластмассовые диаметром от 90 до 100 мм или, если необходимо, 140 мм по ГОСТ 25336.

6.7 Пипетки градуированные, калиброванные только для бактериологического применения, номинальной вместимостью 10, 2 и 1 $см^3$, с ценой деления 0,5 и 0,1 $см^3$ и с выходным отверстием с номинальным диаметром от 2 до 3 мм по ГОСТ 29228.

6.8 Шпатели из стеклянного или пластмассового стержня диаметром приблизительно 3,5 мм и длиной 20 см, изогнутые под прямым углом на расстоянии около 3 см от одного конца; обрезанные концы должны быть ровными (оплавленными).

7 Отбор проб

Отбор проб – по нормативным документам государства, принявшего стандарт.

Важно, чтобы в лабораторию поступала представительная проба, которая не была повреждена или изменена при транспортировке или хранении.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. В случае отсутствия конкретного стандарта на отбор проб продукта рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по процедуре отбора проб.

8 Приготовление пробы для испытания

Пробы для испытания приготавливают в соответствии с [1]–[4], ГОСТ 26669 или стандартом, распространяющимся на конкретный продукт. При отсутствии соответствующего стандарта рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны достигли согласия по этому вопросу.

9 Метод проведения испытания

9.1 Проба для анализа, исходная суспензия и разведения

По [1]–[4], ГОСТ 26669 и соответствующего стандарта на конкретный продукт.

9.2 Инокуляция и инкубация

9.2.1 В каждую из двух стерильных чашек Петри переносят с помощью стерильной пипетки 1 $см^3$ пробы для анализа, если продукт жидкий, или 1 $см^3$ исходной суспензии в случае испытания продукта другой консистенции.

Если необходимо, повторяют процедуру, используя последующие десятичные разведения.

Примечание – Если ожидается рост большого числа молочнокислых бактерий, можно инокулировать только те разведения, которые необходимо для подсчета.

9.2.2 Заливают в каждую чашку Петри приблизительно 15 $см^3$ плотной среды, которая приготовлена и охлаждена до температуры приблизительно 47 °С на водяной бане (см. 6.4).

Тщательно перемешивают посевной материал со средой и дают смеси застыть на горизонтальной поверхности.

9.2.3. При поверхностном способе посева в каждую из двух чашек Петри с агаром переносят с помощью стерильной пипетки 0,1 или 0,2 $см^3$ пробы для анализа, если продукт жидкий, или исходную суспензию в случае испытания продукта другой консистенции. Если необходимо, повторяют процедуру, используя последующие десятичные разведения.

Если для некоторых продуктов необходимо определить небольшое количество микроорганизмов, то пределы обнаружения могут быть увеличены в 10 раз в результате исследования 1,0 $см^3$ пробы для анализа, если исходный продукт жидкий, или 1,0 $см^3$ исходной суспензии для продуктов других консистенций. В этом случае распределяют 1 $см^3$ инокулята или на поверхности большой чашки Петри (диаметром 140 мм) или на поверхности пяти маленьких чашек (диаметром 90 мм). В обоих случаях посевы проводят в двух повторностях, используя две большие чашки или десять маленьких чашек.

Примечание – Посев на поверхность в сочетании с инкубацией в анаэробных или микроаэробных условиях применяют вместо посева заливкой.

Ограничение доступа кислорода осуществляют одним из способов, указанных в ГОСТ 30425–97:

на застывшую плотную питательную среду в чашках Петри наливают второй слой расплавленной и охлажденной до (45 ± 1) °С плотной среды в объеме приблизительно 5,0 $см^3$ и оставляют для затвердения;

чашки Петри помещают в газовую среду, состоящую из 95 % N_2 и 5 % CO_2;

чашки Петри помещают в анаэростат. Аппарат закрывают и создают вакуум 86,6-93,3 кПа;

в каждую пробирку с жидкой средой наслаивают стерильный жидкий парафин в количестве, необходимым для получения высоты столба равным приблизительно 2 см.

Тщательно и быстро распределяют инокулят по поверхности чашки с агаром, не касаясь сторон чашки шпателем (см. 6.8). Используют новый стерильный шпатель для каждой чашки. Оставляют чашки с закрытыми крышками на 15 мин при температуре окружающей среды для впитывания инокулята агаром.

9.2.4 Переворачивают засеянные чашки Петри (донышком вверх) и помещают в инкубатор (см. 6.3).

Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С не более 5 сут. Допускается инкубировать посевы не более 3 сут при температуре (37 ± 1) °С.

Необходимо избегать подсушивания агара во время инкубации, чтобы среда не угнетала рост микроорганизмов.

9.2.5 При определении количества молочнокислых микроорганизмов по методу НВЧ или при выявлении молочнокислых микроорганизмов в определенной анализируемой пробе продукта проводят посевы в жидкую среду. При определении количества молочнокислых микроорганизмов по методу НВЧ каждую анализируемую пробу исследуемого продукта и (или) его разведение в трехкратной повторности высевают в пробирки с жидкой средой, высевают не менее трех последовательных анализируемых проб исследуемого продукта и (или) его разведения, отличающиеся по количеству продукта в них в 10 раз.

При выявлении молочнокислых микроорганизмов в определенной анализируемой пробе продукта, эту анализируемую пробу высевают в жидкую среду. Соотношение количества высеваемого продукта к количеству среды должно быть не менее 1:9.

Если при внесении продукта цвет среды меняется (за счет изменения величины pH), то его восстанавливают с помощью стерильных растворов щелочи и кислоты.

Посевы на жидких средах инкубируют по 9.2.4, ежедневно просматривают, инкубирование посевов прекращают при появлении видимых признаков роста. Рост молочнокислых микроорганизмов на жидкой среде сопровождается изменением цвета среды от фиолетового до желтого, помутнением среды или образованием осадка, возможно выделение газа.

Из пробирок с признаками роста проводят пересев петлей на плотную среду так, чтобы получить рост изолированных колоний.

9.2.6 Предварительный подсчет количества выросших колоний на плотных средах проводят через 48 ч. После термостатирования посевов по 9.2.4 отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 типичных колоний. Характеристика типичных для молочнокислых микроорганизмов колоний приведена в приложении А.

9.2.7 Для подтверждения принадлежности типичных колоний к молочнокислым микроорганизмам отбирают из посевов не менее 5 колоний. Принадлежность каждой отобранной колонии к определенным микроорганизмам устанавливают по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы, дополнительно при идентификации бактерий рода Leuconostoc определяют наличие капсул, при идентификации стрептококков рода Streptococcus отсутствие роста в мясо-пептонном бульоне с 9,6 ед. pH и в мясопептонном бульоне с 6,5 % NaCl.

9.2.7.1 Для определения отношения микроорганизмов к окраске по Граму из колоний приготавливают мазки, окрашивают их по ГОСТ 30425 и микроскопируют. Допускается окраску по Граму заменять тестом Грегерсена. Для этого на предметном стекле в капле 3 %-ного водного раствора калия гидроокиси эмульгируют культуру микроорганизмов, взятую из колонии с плотной среды. Если через несколько секунд взвесь ослизняется и за петлей тянутся слизистые нити, то это указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательным бактериям. У грамположительных бактерий слизистых нитей не образуется.

9.2.7.2 Для изучения подвижности микроорганизмов из колоний приготавливают препараты методом висячей или раздавленной капли и микроскопируют. Результаты микроскопирования оценивают в соответствии с приложением Б. Подвижность допускается определять посевом в полужидкие среды.

9.2.7.3 Каталазную активность культур определяют по ГОСТ 30425.

Результаты определения каталазной активности оценивают в соответствии с приложением Б.

Разложение перекиси водорода у бактерий рода Pediococcus возможно за счет фермента псевдокаталазы. Поэтому при определении молочнокислых микроорганизмов или бактерий рода Pediococcus в случае, если в характерных колониях обнаружены грамположительные, неподвижные микроорганизмы, дающие положительную каталазную реакцию, контролируют отсутствие цитохромов путем постановки бензидинового теста. Дня этого выросшие на чашках Петри колонин микроорганизмов 24–48-часового возраста заливают раствором бензидина, приготовленным по 5.10. После того, как раствор пропитает колонии, прибавляют в чашку приблизительно такой же объем 5 %-ной перекиси водорода. Молочнокислые микроорганизмы, в том числе рода Pediococcus, не содержат цитохромов. В случае присутствия цитохромов колонии окрашиваются в голубовато-зеленый или ярко-голубой цвет.

При отсутствии бензидина допускается проводить определение наличия псевлокаталазы на среде, приготовленной по 5.6, с низкой концентрацией глюкозы 0,05 %.

Посевы инкубируют по 9.2.4, определение псевдокаталазы проводят также как и каталазы по ГОСТ 30425.

Культуры, образующие псевдокаталазу, относят к роду Pediococcus.

9.2.7.4 При идентификации бактерий рода Leuconostoc готовят препараты и окрашивают их по Бури для выявлення бактериальных капсул. Для этого на хорошо обезжиренном и обожженном предметном стекле смешивают каплю бактериальной культуры с мелким порошком черной туши или суспензией нигрозина, приготовленной по 5.9.

С помощью другого стекла со шлифованными краями быстро готовят тонкий мазок, который фиксируют, несколько раз проводя его через пламя горелки. Мазок докрашивают раствором кристаллического фиолетового или рабочим раствором карбофуксина, приготовленном по 5.11. Мазок осторожно промывают в сосуде с водой, оставляют на воздухе для высыхания и микроскопируют. Не допускается сушить мазок между листами фильтровальной бумаги. Фон препарата окрашивается тонкой суспензией черной туши или нигрозина. Тела бактерий окрашиваются монохроматично, капсулы остаются неокрашенными.

9.2.7.5 При идентификации микроорганизмов рода Streptococcus определяют отсутствие роста на мясопептонном бульоне с 9,6 ед. pH и на мясопептонном бульоне с содержанием хлористого натрия 6,5 %. Для этого культуры, полученные по 9.2.7, пересевают на среды, приготовленные по 5.7 и 5.8.

Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение 3 сут.

10 Обработка результатов

10.1 Результаты анализа продукта оценивают по каждой пробе отдельно.

10.2 Если при изучении культуральных. морфологических и биохимических свойств при определении:

- молочнокислых микроорганизмов обнаружены грамположительные, неподвижные, каталазоотринательные палочки или неспорообразуюшие. грамположителыше, неподвижные, каталазоотринательные или образующие псевдокаталазу кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к мезофильным молочнокислым;

- бактерий рода Lactobacillus обнаружены неспорообразуюшие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Lactobacillus;

- бактерий рода Leuconostoc обнаружены неспорообразующие, грамположительные. неподвижные, каталазоотрицательные. окруженные капсулой кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Leuconostoc;

- бактерий рода Streptococcus обнаружены неспорообразуюшие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с 9,6 ед. pH и 6,5 % NaCl, кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Streptococcus;

- бактерий рода Pediococcus обнаружены неспорообразующие. грамположтельные, неподвижные, каталазоотрицательные (или каталазоположительные, но дающие отрицательный бензидиновый тест) или псевдокаталазоположительные кокки, то дают заключение о том. что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Pediococcus;

10.3 Если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост определенных групп или родов микроорганизмов, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри, принадлежат к этой группе или роду. В остальных случаях количество микроорганизмов определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

10.4 При определении НВЧ или при посеве продукта на жидкие среды пробирки с посевами считают положительными, если при последующем пересеве на плотные среды и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии обнаружены молочнокислые микроорганизмы.

10.5 Для подсчета наиболее вероятного числа (НВЧ) молочнокислых микроорганизмов в 1 г или 1 $см^3$ пользуются таблицей и указанием к таблице ГОСТ 26670 или нормативными документами стран, принявших стандарт.

10.6 Результаты определения присутствия микроорганизмов в определенной анализируемой пробе продукта выражают следующим образом: молочнокислые микроорганизмы (при необходимости указывается род) обнаружены или не обнаружены в пробе продукта.

10.7 Результаты количественного определения по методу НВЧ или посевом на чашки Петри записывают по ГОСТ 26670.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) применяемый метод отбора проб, если он известен;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) температуру инкубации;

e) все рабочие подробности, не установленные в настоящем стандарте, или считающиеся необязательными, вместе с подробностями всех инцидентов, которые могли бы повлиять на результат(ы) испытания;

f) полученный(ые) результат(ы) испытания.

12 Требования безопасности

Общие требования проведения микробиологического анализа и требования к персоналу – по ГОСТ ISO 7218.

Приложение А
(справочное)

Характеристика колоний молочнокислых микроорганизмов на плотных средах

Характеристика колоний молочнокислых микроорганизмов на плотных средах приведена в таблице А.

Таблица А

Наименование микроорганизмов	Питательная среда	Характеристика колоний
Молочнокислые микроорганизмы	Бликфельдта плотная, среда Ли MRS плотная	Колонии мелкие гладкие или шероховатые с зонами просветления Колонии бесцветные диаметром 1–3 мм линзовидной или звездообразной формы
Бактерии рода Lactobacillus	Бликфельдта плотная, среда Ли	Колонии мелкие гладкие или шероховатые с зонами просветления
Слизеобразующие бактерии рода Leuconostoc	Бликфельдта плотная, среда Ли	Колонии выпуклые, округлые слизистые. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи
Стрептококки рода Streptococcus и бактерии рода Pediococcus	Бликфельдта плотная, среда Ли	Колонии мелкие гладкие или шероховатые с зонами просветления

Приложение Б
(справочное)

Характеристика молочнокислых микроорганизмов

Таблица Б

Наименование микроорганизмов	Характеристика
Молочнокислые микроорганизмы	Неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки или неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки
Бактерии рода Lactobacillus	Неспорообразующие, грамположительные короткие или длинные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки
Слизеобразующие бактерии рода Leuconostoc	Неспорообразующие, грамположительные, имеющие сферическую или овальную форму, располагающиеся попарно или в цепочках, окруженные капсулой, которая по Граму не окрашивается, неподвижные, каталазоотрицательные кокки
Стрептококки рода Streptococcus	Неспорообразующие, грамположительные, располагающиеся в виде коротких или длинных цепочек, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с 9,6 ед. pH и 6,5 % NaCl кокки
Бактерии рода Pediococcus	Неспорообразующие, грамположительные, располагающиеся парами и тетрадами. неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки

Приложение ДА
(справочное)

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта

Таблица ДА.1

Структура международного стандарта			Структура межгосударственного стандарта		
Раздел	Пункт	Подпункт	Раздел	Пункт	Подпункт
4	4.1	–	4	–	–
	4.2	–		–	–
	4.3	–		–	–
5	5.1	–	5	–	–
	5.2	–		5.1	
	5.3	–		5.2	5.2.1
	–	5.3.1		–	5.2.1.1
	–	5.3.2.1		–	5.2.2
	–	5.3.2.2		–	–
	–	–		5.3–5.12	–
6	6.1	–	6	6.1	–
	6.2	–		6.2	–
	6.3	–		6.6	–
	6.4	–		6.7	–
	6.5	–		6.3	–
	6.6	–		6.4	–
	6.7	–		6.5	–
9	–	–	9	–	9.2.4–9.2.5
	9.3	–		–	9.2.6
10	–	10.2.1–10.2.2	10	10.3	–
	–	–		10.4–10.7	–
11	–	–	–	–	–
12	–	–	11	–	–
–	–	–	Приложение А	А.1–А.2	–

Примечание
Сравнение структур стандартов приведено по разделам 4,5,6,9,10,11 и 12, так как остальные разделы стандартов и их иные структурные элементы идентичны

Библиография

[1] 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 (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений)

[2] ISO 6887-2:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для приготовления мяса и мясных продуктов)

[3] ISO 6887-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов)

[4] ISO 6887-4:2003/Amd.1:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов, рыбы и рыбных продуктов)

УДК 663/664:543.9:006.354 МКС 07.100.30 MOD

Ключевые слова: продукты пищевые, корма для животных, метод наиболее вероятного числа (НВЧ), методы посева в или на плотные среды, инкубирование посевов, мезофильные молочнокислые микроорганизмы, стрептококки, каталаза, псевдокаталаза, окраска по Граму, подвижность

Подписано в печать 01.09.2014. Формат 60x841/8.
Усл. печ. л. 2,32. Тираж 94 экз. Зак. 3429.

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