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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31708— 2012 (ISO 7251:2005)

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ

Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli.* Метод наиболее вероятного числа

(ISO 7251:2005, 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 Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации (ОАО «ВНИИС») совместно с Государственным учреждением «Ярославская государственная испытательная лаборатория молочного сырья и продукции» на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 октября 2012 г. № 51)

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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 7251:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* — Most probable number technique (Микробиология пищевых продуктов и кормов. Горизонтальный метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*. Метод наиболее вероятного числа) путем изменения отдельных фраз (слов, значений показателей, ссылок), которые выделены в тексте курсивом.

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

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которых подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и межгосударственных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Степень соответствия — модифицированная (MOD).

Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52830—2007 (ИСО 7251:2005)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1761-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31708—2012 (ISO 7251:2005) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

6 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, 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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Принцип *метода* 2
4.1 Метод *качественного определения* 2
4.2 Метод количественного определения 2
5 Разведение, питательные среды и реактивы 3
6 Оборудование и лабораторная посуда 4
7 Отбор проб 4
8 Подготовка проб 5
9 *Проведение определения* 5
9.1 Метод *качественного определения* 5
9.2 Метод количественного определения 6
10 *Результаты определения* 7
10.1 Метод *качественного определения* 7
10.2 Метод *количественного определения* 7
11 Протокол испытания 7
Приложение А (обязательное) Расчет наиболее вероятного числа (НВЧ) 8
Библиография 12

Поправка к ГОСТ 31708—2012 (ISO 7251:2005) Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*. Метод наиболее вероятного числа

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	АМ	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ

Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli* Метод наиболее вероятного числа

Microbiology of food and stuffs
Method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*
Most probable number technique

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli* методом культивирования в жидких питательных средах и расчета наиболее вероятного числа (НВЧ) после инкубации при *температуре* 37 °С и 44 °С.

Настоящий стандарт применяют при исследовании продуктов, предназначенных для употребления в пищу человеком и для кормления животных, а также образцов окружающей среды в местах производства и оборота пищевых продуктов.

Примечание — Некоторые патогенные штаммы Escherichia coli не растут при температуре 44 °С.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ ISO 11133-1—2011 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 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

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

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.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **презумптивная *Escherichia coli*** (presumptive *Escherichia coli*): Бактерия, ферментирующая при *температуре* 44 °С лактозу с образованием газа и образующая индол из триптофана при проведении опыта в соответствии с методом, указанным в настоящем стандарте.

3.2 **количество презумптивных бактерий *Escherichia coli*:** Наиболее вероятное число E.coli в $см^3$ или г образца при условии проведения опыта в соответствии с методом, указанным в настоящем стандарте.

4 Принцип *метода*

4.1 Метод *качественного определения*

4.1.1 Определенное количество первичного разведения образца вносят в пробирку с жидкой селективной обогатительной средой.

4.1.2 Пробирку инкубируют до 48 ч при *температуре* 37 °С. Для обнаружения газообразования пробирку проверяют через 24 и 48 ч инкубации.

4.1.3 При обнаружении затемнения, образования хлопьев или вспенивания среды проводят пересев в пробирку с жидкой селективной средой (ЕС-бульон).

4.1.4 После пересева согласно 4.1.3 пробирку инкубируют до 48 ч при *температуре* 44 °С. Для обнаружения газообразования пробирку проверяют через 24 и 48 ч инкубации.

4.1.5 При обнаружении вспенивания среды в пробирке после инкубации согласно 4.1.4 проводят пересев в пробирку с безиндольной пептонной водой.

4.1.6 После пересева согласно 4.1.5 пробирку инкубируют до 48 ч при *температуре* 44 °С. Пробирку проверяют для обнаружения образования индола при распаде триптофана в составе пептона.

4.1.7 Пробирки с затемнением, образованием хлопьев или газообразованием в жидкой селективной обогатительной среде (*см.* 4.1.1), при пересеве из которых в ЕС-бульон обнаружилось газообразование и образование индола в пептонной воде при *температуре* 44 °С, расценивают как содержащие презумптивную *Escherichia coli*. Результат выражается как «презумптивная *Escherichia coli* обнаружена» или «презумптивная *Escherichia coli* не обнаружена (отсутствует)» в *граммах* или $см^3$ продукта.

4.2 Метод количественного определения

4.2.1 Определенное количество первичного разведения образца вносят в три пробирки с жидкой селективной обогатительной средой двойной концентрации.

4.2.2 Определенное количество первичного разведения образца вносят в три пробирки с жидкой обогатительной средой одинарной концентрации. Затем в аналогичных условиях определенные количества десятикратного разведения образца вносят в другие три пробирки с жидкой обогатительной средой одинарной концентрации.

4.2.3 Пробирки со средами двойной и одинарной концентрации инкубируют до 48 ч при *температуре* 37 °С. После 24 и 48 ч инкубации пробирки исследуют для обнаружения газообразования.

4.2.4 Из каждой пробирки со средой двойной концентрации, в которой обнаружено затемнение, образование хлопьев или вспенивание среды, а также из каждой пробирки со средой одинарной концентрации, в которой обнаружено вспенивание, *осуществляют* пересев в пробирку с жидкой селективной средой (ЕС-бульон).

4.2.5 После пересева согласно 4.2.4 пробирки инкубируют до 48 ч при *температуре* 44 °С. Для обнаружения газообразования пробирки проверяют через 24 и 48 ч инкубации.

4.2.6 При обнаружении вспенивания среды в пробирках после инкубации согласно 4.2.5 проводят пересев из них в пробирки с безиндольной пептонной водой.

4.2.7 После пересева согласно 4.2.6 пробирку инкубируют до 48 ч при *температуре* 44 °С. Пробирки проверяют для обнаружения образования индола при распаде триптофана в составе пептона.

4.2.8 Наиболее вероятное число *Escherichia coli* рассчитывают с помощью таблицы НВЧ (приложение А), в зависимости от числа пробирок с селективной обогатительной средой одинарной и двойной концентрации, при пересеве из которых в ЕС-бульон обнаружилось газообразование и образование индола в пептонной воде при *температуре* 44 °С.

5 Разведение, питательные среды и реактивы

Для текущей лабораторной практики применяют *ГОСТ ISO 7218*.

5.1 Разведения

В общем случае *согласно ГОСТ ISO 7218*, для молочных продуктов — [1].

5.2 Селективная обогатительная среда (бульон с лаурилсульфатом)

5.2.1 Состав *среды — в соответствии с таблицей 1*.

Таблица 1

Состав среды	a) *Для среды* двойной концентрации	b) *Для среды* одинарной концентрации
Ферментативный перевар растительных и животных тканей, г	40,0	20,0
Лактоза, г	10,0	5,0
Моногидрофосфат калия (K_2HPO_4), г	5,5	2,75
Дигидрофосфат калия (KH_2PO_4), г	5,5	2,75
Хлорид натрия, г	10,0	5,0
Лаурилсульфат натрия [$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$], г	0,2	0,1
Вода, $см^3$	1000	1000

5.2.2 Приготовление среды

Растворяют компоненты среды или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал 6,8 ± 0,2 при *температуре* 25 °С.

Среду одинарной концентрации разливают по 9 $см^3$ в пробирки 16 × 160 мм (*см.* 6.4) с пробирками-поплавками Дарема (*Уленгута*) (*см.* 6.6), среду двойной концентрации разливают по 10 $см^3$ в пробирки 18 × 180 мм (*см.* 6.4) с пробирками-поплавками Дарема (*Уленгута*) (*см.* 6.6).

Стерилизуют в автоклаве (*см.* 6.1) 15 мин при *температуре* 121 °С.

После стерилизации пробирки-поплавки Дарема (*Уленгута*) не должны содержать пузырьков воздуха.

5.3 ЕС-бульон (селективная среда)

5.3.1 Состав:

ферментативный перевар казеина ..... 20,0 г;
лактоза ..... 5,0 г;
желчные соли № 3 [2] ..... 1,5 г;
моногидрофосфат калия (K_2HPO_4) ..... 4,0 г;
дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) ..... 1,5 г;
хлорид натрия ..... 5,0 г;
вода ..... 1000 $см^3$.

5.3.2 Приготовление среды

Растворяют компоненты среды или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают. Устанавливают такой уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал 6,8 ± 0,2 при *температуре* 25 °С.

Среду разливают по 10 $см^3$ в пробирки 16 × 160 мм (*см.* 6.4) с пробирками-поплавками Дарема (*Уленгута*) (*см.* 6.6).

Стерилизуют в автоклаве (*см.* 6.1) 15 мин при *температуре* 121 °С.

После стерилизации пробирки-поплавки Дарема (*Улентута*) не должны содержать пузырьков воздуха.

5.3.3 Проверка пригодности и обеспечение качества питательных сред *согласно ГОСТ ISO 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.*

5.4 Пептонная вода безиндольная

5.4.1 Состав:

ферментативный перевар казеина ..... 10,0 г;

хлорид натрия..... 5,0 г;

вода .....1000 $см^3$.

5.4.2 Растворяют компоненты среды или готовую дегидратированную питательную среду в воде, при необходимости подогревают. Доводят pH, если необходимо, до такого значения, чтобы после стерилизации оно составляло (7,3 ± 0,2) при *температуре* 25 °С.

Среду разливают по 5—10 $см^3$ в пробирки 16 × 160 мм (*см.* 6.4).

Стерилизуют в автоклаве (*см.* 6.1) 15 мин при *температуре* 121 °С.

5.5 Реактив для определения индола (реактив Ковача)

5.5.1 Состав:

4-диметиламинобензальдегид ..... 5,0 г;

2-метилбутан-1-ол или пентан-1-ол .....75,0 $см^3$;

соляная кислота (ρ_{20} 1,18—1,19 г/$см^3$)……..…..25,0 $см^3$.

5.5.2 Приготовление реактива

Растворяют 4-диметиламинобензальдегид в 2-метилбутан-1-оле или пентан-1-оле при нагревании на водяной бане, поддерживающей температуру от 50 °С до 55 °С.

Охлаждают и добавляют соляную кислоту.

Хранят *реактив,* защищенный от света, при температуре около 4 °С.

Цвет реактива должен быть от светло-желтого до светло-коричневого.

Примечание — *Допускается* использовать готовые коммерческие реактивы.

6 Оборудование и лабораторная посуда

Примечание — При одинаковой спецификации одноразовое оборудование предпочтительнее многоразового.

Обычное лабораторное оборудование, *а также* следующее:

6.1 Стерилизаторы сухожаровые (печи) или паровые (автоклавы).

6.2 Термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С и (44 ± 1) °С.

6.3 Водяная баня, поддерживающая температуру (44 ± 1) °С.

6.4 Пробирки размерами 16 × 160 мм и 18 × 180 мм или 20 × 200 мм.

6.5 Бактериологическая петля из платино-иридиевого или никельхромового сплава *диаметром* около 3 мм, *вмещающая за один раз около 10 $мм^3$ среды.*

6.6 Пробирки-поплавки Дарема (*Улентута*), свободно помещающиеся в пробирки (*см.* 6.4).

6.7 Пипетки с полным сливом номинальным объемом от 1 до 10 $см^3$.

6.8 pH-метр с разрешением 0,01 единицы pH и точностью ± 0,1 pH при *температуре* 25 °С.

7 Отбор проб

В лабораторию направляют представительный образец. Образец не должен быть поврежден или изменен в *процессе* транспортирования или хранения.

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ 26668. Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон по отбору проб конкретного продукта при отсутствии соответствующего стандарта.

8 Подготовка проб

Подготовку проб проводят в соответствии *ГОСТ 26669.* Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон *по* подготовке проб конкретного продукта при отсутствии *соответствующего* стандарта.

9 *Проведение определения*

9.1 Метод *качественного определения*

9.1.1 *Приготовление пробы и первичного разведения в зависимости от вида продукта согласно ГОСТ 26669, [3], [4], [5], [6] или [7].*

Состав ЕС-бульона с лаурилсульфатом при определенной концентрации согласно таблице 1 a) и b).

Добавляют 1 см^3 первичного разведения к 9 см^3 бульона с лаурилсульфатом одинарной концентрации (0,1 г или 0,1 см^3 образца) или 10 см^3 первоначального разведения к 10 см^3 бульона с лаурилсульфатом двойной концентрации (1 г или 1 см^3 образца). Для бóльших объемов пробы первичное разведение приготавливают добавлением *0,1* см^3 или *0,1* г к 9 см^3 разбавителя (*[3], [4]* или [7]), затем добавляют весь объем первичного разведения к 90 см^3 бульона с лаурилсульфатом одинарной концентрации. Например, добавляют 5 см^3 или 5 г образца к 45 см^3 разбавителя и весь объем начальной суспензии вносят в 450 см^3 бульона с лаурилсульфатом одинарной концентрации или вносят пробу в равный объем.

9.1.2 Инкубация селективного обогатительного бульона (бульона с лаурилсульфатом)

Инокулированный бульон с лаурилсульфатом одинарной или двойной концентрации (*см.* 5.2) инкубируют в термостате (*см.* 6.2) *при температуре* 37 °С в течение (24 ± 2) ч. Если на этой стадии не обнаруживают ни газообразования, ни замутнения среды, затрудняющего определение газообразования, продолжают инкубацию до (48 ± 2) ч.

Примечание — Время инкубации проб живых моллюсков должно составлять (48 ± 2) ч.

При исследовании некоторых молочных продуктов (например, казеина) пробирки-поплавки Дарема могут застревать на дне пробирки с селективной обогатительной средой. Если после 48 ч инкубации в пробирке обнаруживают лишь помутнение без газообразования, то также осуществляют пересев в ЕС-бульон согласно 9.1.3.

9.1.3 Инокуляция и инкубация селективной среды (ЕС-бульона)

При обнаружении помутнения, выпадения осадка или видимого газообразования после инкубации (см. 9.1.2) селективной среды двойной концентрации или при обнаружении видимого газообразования после инкубации селективной среды одинарной концентрации с помощью бактериологической петли (*см.* 6.5) проводят пересев в пробирку с ЕС-бульоном. Инокулированный ЕС-бульон инкубируют на водяной бане (*см.* 6.3) или в термостате (*см.* 6.2) (24 ± 2) ч при температуре 44 °С. Если на этой стадии не обнаруживают видимого газообразования в ЕС-бульоне (*см.* 5.3), то общее время инкубации продлевают до (48 ± 2) ч.

Примечание — Общее время инкубации проб живых моллюсков должно составлять (24 ± 2) ч.

9.1.4 Инокуляция и инкубация пептонной воды

При обнаружении видимого газообразования после инкубации согласно 9.1.3 с помощью бактериологической петли (*см.* 6.5) производят пересев в пробирку с пептонной водой (*см.* 5.4), предварительно прогретой до *температуры* 44 °С. Инкубируют (48 ± 2) ч при *температуре* 44 °С.

9.1.5 Обнаружение образования индола

В пробирку с пептонной водой (*см.* 5.4) после инкубации согласно 9.1.4 добавляют 0,5 см^3 реактива на индол (*см.* 5.5). После интенсивного перемешивания через 1 мин проводят оценку реакции. Красное окрашивание в спиртовой фазе свидетельствует о наличии индола.

9.1.6 Оценка результатов

При обнаружении видимого газообразования в пробирке с ЕС-бульоном и образования индола в пробирке с пептонной водой *(см. 9.1.2—9.1.4)* селективную обогатительную среду *оценивают* как положительную (презумптивная *Escherichia coli* обнаружена).

9.2 Метод количественного определения

9.2.1 *Приготовление пробы и первичного разведения в зависимости от вида продукта по ГОСТ 26669.*

Подготавливают достаточное число разведений, чтобы в максимальном разведении с уверенностью получить отрицательный результат.

9.2.2 Инокуляция и инкубация селективного обогатительного бульона (бульона с лаурилсульфатом)

9.2.2.1 Подготавливают ряд последовательных разведений, по три пробирки на каждое разведение. Для проб живых моллюсков и некоторых других особых продуктов, а также для получения большей точности результатов необходимо использовать по пять пробирок на каждое разведение (*см.* приложение А).

9.2.2.2 Берут три пробирки с селективной обогатительной средой двойной концентрации [*см. таблицу 1* a)] и, используя стерильную пипетку (*см.* 6.7), в каждую пробирку вносят по 10 см^3 первичного разведения. Таким образом, каждая пробирка этого ряда будет содержать по 1 г образца.

9.2.2.3 Берут три пробирки с селективной обогатительной средой одинарной концентрации [*см. таблицу 1* b)] и, используя новую стерильную пипетку (*см.* 6.7), в каждую пробирку вносят по 1 см^3 первичного разведения. Таким образом, каждая пробирка этого ряда будет содержать по 0,1 г образца.

9.2.2.4 Для каждого последующего разведения (соответствующего 0,01 г, 0,001 г и т. д. продукта на пробирку) повторяют процедуру, как в 9.2.2.3, используя для каждого разведения новую пипетку. Инокулят и среду тщательно перемешивают.

9.2.2.5 Инокулированные среды с лаурилсульфатом двойной по 9.2.2.1 или одинарной концентрации по 9.2.2.3 и 9.2.2.4 инкубируют в термостате (*см.* 6.2) *при температуре* 37 °С в течение (24 ± 2) ч. Если на этой стадии не обнаруживают ни газообразования, ни замутнения среды, затрудняющего определение газообразования, продолжают инкубацию до (48 ± 2) ч.

Примечание — Время инкубации проб живых моллюсков должно составлять (48 ± 2) ч.

При исследовании некоторых молочных продуктов (например, казеина) пробирки-поплавки Дарема могут застревать на дне пробирки с селективной обогатительной средой. Если после 48 ч инкубации в пробирке обнаруживают лишь помутнение без газообразования, то также осуществляют пересев в ЕС-бульон согласно 9.2.3.

9.2.3 Инокуляция и инкубация селективной среды (ЕС-бульона)

9.2.3.1 При обнаружении помутнения, выпадения осадка или видимого газообразования после инкубации селективной среды двойной концентрации [*см. таблицу 1* a)] согласно 9.2.2.5 или при обнаружении видимого газообразования после инкубации селективной среды одинарной концентрации [*см. таблицу 1* b)] согласно 9.2.2.5 с помощью бактериологической петли (*см.* 6.5) проводят пересев в пробирку с ЕС-бульоном (*см.* 5.3).

9.2.3.2 Инокулированный согласно 9.2.3.1 ЕС-бульон инкубируют на водяной бане (*см.* 6.3) или в термостате (*см.* 6.2) (24 ± 2) ч при температуре 44 °С. Если на этой стадии не обнаруживают видимого газообразования в ЕС-бульоне (*см.* 5.3), то общее время инкубации продлевают до (48 ± 2) ч.

Примечание — Общее время инкубации проб живых моллюсков должно составлять (24 ± 2) ч.

9.2.4 Инокуляция и инкубация пептонной воды

При обнаружении видимого газообразования после инкубации согласно 9.2.3.2 с помощью бактериологической петли (*см.* 6.5) производят пересев в пробирку с пептонной водой (*см* .5.4), предварительно прогретой до *температуры* 44 °С. Инкубируют (48 ± 2) ч *при температуре* 44 °С.

9.2.5 Обнаружение образования индола

В пробирку с пептонной водой (*см.* 5.4) после инкубации согласно 9.2.4 добавляют 0,5 см^3 реактива на индол (*см.* 5.5). После интенсивного перемешивания через 1 мин проводят оценку реакции. Красное окрашивание в спиртовой фазе свидетельствует о наличии индола.

9.2.6 Оценка результатов

При обнаружении видимого газообразования в пробирке с ЕС-бульоном и образования индола в пробирке с пептонной водой *(см. 9.2.2—9.2.4)* селективную обогатительную среду *оценивают* как положительную (презумптивная *Escherichia coli* обнаружена).

Для каждого разведения определяют число положительных результатов для среды двойной концентрации [*см. таблицу 1* a)] и одинарной концентрации [*см. таблицу 1* b)].

10 *Результаты определения*

10.1 Метод *качественного определения*

Исходя из оценки результатов (*см.* 9.1.6), конечный результат *определения* выражают как «презумптивная *Escherichia coli* обнаружена» или «не обнаружена (отсутствует)» в данном объеме пробы, указывая массу пробы в граммах или объем пробы в $см^3$.

10.2 Метод *количественного определения*

Расчет НВЧ проводят согласно приложению А.

Пример — При исследовании твердого образца и использовании трех пробирок на разведение для 95 % случаев доверительный интервал составляет от 13 до 200 презумптивных Escherichia coli в грамме при НВЧ 7,4 × 10 презумптивных Escherichia coli в грамме и от 4 до 99 презумптивных Escherichia coli в грамме при НВЧ 2,4 × 10 презумптивных Escherichia coli в грамме.

11 Протокол испытания

В протоколе испытания указывают:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- метод отбора пробы, если известен;
- использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- все детали исследования, не оговариваемые в настоящем стандарте, или рассматриваемые как необязательные, а также детали иного свойства, могущие оказать влияние на результаты исследований;
- полученные результаты.

Приложение А
(обязательное)

Расчет наиболее вероятного числа (НВЧ)

А.1 Расчет НВЧ при использовании трех пробирок — *по ГОСТ ISO 7218.*

А.2 Расчет НВЧ при использовании пяти пробирок представлен в таблице А.1.

Таблица А.1

Число положительных пробирок трех выбранных разведений			НВЧ	Категория* *оценки для одновременно проанализированных проб в количестве*					*Действительное число микроорганизмов в 1 г (см^3) с вероятностью*			
									95 %		*99 %*	
1,0	*0,1*	*0,01*		1	2	3	5	10	*от*	*до*	*от*	*до*
0	0	0	<0,18	—	—	—	—	—	0,00	0,65	0,00	0,93
0	0	1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0	1	0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0	1	1	0,36	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	1	0,55	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0	3	0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	0	0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1	0	1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1	0	2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1	1	1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1	2	0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1	2	1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	0	0,83	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1	4	0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
2	0	0	0,45	1	1	1	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10
2	0	1	0,68	2	1	1	1	1	0,18	1,50	0,09	2,10
2	0	2	0,91	0	3	3	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	0	0,68	1	1	1	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30
2	1	1	0,92	2	2	1	1	1	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2	2	1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4

Продолжение таблицы А.1

Число положительных пробирок трех выбранных разведений			НВЧ	Категория* *оценки для одновременно проанализированных проб в количестве*					*Действительное число микроорганизмов в 1 г ($см^3$) с вероятностью*			
									95 %		*99 %*	
1,0	*0,1*	*0,01*		1	2	3	5	10	*от*	*до*	*от*	*до*
2	3	0	1,2	3	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2	3	1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	4	0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3	0	0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3	0	1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3	0	2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3	1	1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3	2	2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	4	0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3	4	1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	5	0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	0	0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4	0	1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4
4	0	2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4	0	3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4	1	1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4	1	2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1
4	2	1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	3	3,8	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4	3	0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7

Продолжение таблицы А.1

Число положительных пробирок трех выбранных разведений			НВЧ	Категория* *оценки для одновременно проанализированных проб в количестве*					*Действительное число микроорганизмов в 1 г (см^3) с вероятностью*			
									95 %		*99 %*	
1,0	*0,1*	*0,01*		1	2	3	5	10	*от*	*до*	*от*	*до*
4	4	0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4	5	0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	5	1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5	0	1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5	0	2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5	0	3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5	1	1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5	1	2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5	2	0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5	2	1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,8	1,4	23,0
5	2	2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5	2	3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5	2	4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5	3	0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5	3	1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5	3	2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5	3	3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5	3	4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5	4	0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5	4	1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5	4	2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5	4	3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5	4	4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5	4	5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5	5	0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5	5	1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5	5	2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5	5	3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338

Окончание таблицы А.1

Число положительных пробирок трех выбранных разведений			НВЧ	Категория* *оценки для одновременно проанализированных проб в количестве*					*Действительное число микроорганизмов в 1 г (см^3) с вероятностью*			
									95 %		*99 %*	
1,0	*0,1*	*0,01*		1	2	3	5	10	*от*	*до*	*от*	*до*
5	5	4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5	5	5	>160	1	1	1	1	1	—	—	—	—

* Для объяснения категорий *см. ГОСТ ISO 7218.*

Примечание — Приведенные результаты основаны на данных источника [7].

Библиография

[1] ISO 8261:2001 Молоко и молочные продукты. Общие руководящие указания по приготовлению проб для испытаний, исходных суспензий и растворов, разведенных 1/10, для микробиологических исследований

[2] ICMSF Microorganisms in Food, 1988, Vol. 1, p. 280, University of Toronto Press, Toronto, Canada

[3] 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)

[4] 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. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила подготовки мяса и мясных продуктов)

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

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

[7] De Man, J.C. MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Biotechnol., 1983, 17, pp. 301—305

УДК 663/664.777:006.354 МКС 67.040 65.120 MOD

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиология, горизонтальный метод обнаружения, презумптивные бактерии, наиболее вероятное число, *Escherichia coli*

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 25.09.2014. Подписано в печать 14.10.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,75. Тираж 106 экз. Зак. 4270.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru