ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53985— 2010

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод обнаружения и подсчета бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). Метод наиболее вероятного числа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2010 г. № 556-ст

4 В настоящем стандарте учтены основные положения международного стандарта:
ИСО 4831:2006 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета колиформных бактерий. Методика наиболее вероятного числа (ISO 4831:2006 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique»)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2011

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод обнаружения и подсчета бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). Метод наиболее вероятного числа

Animal feeding stuffs.
Method for the detection and enumeration of coliforms. Most probable number technique

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма для животных и устанавливает метод обнаружения и подсчета наиболее вероятного числа (НВЧ) бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

Метод наиболее вероятного числа колиформных бактерий предназначен для кормов, содержащих искомое количество микроорганизмов в диапазоне от 1 до 100 на миллилитр или грамм анализируемой пробы.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 7218—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культурных сред в лаборатории

ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008 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 Р 51426—99 (ИСО 6887—83) Микробиология. Корма, комбикорма, комбинированное сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

ГОСТ Р 52816—2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 25311—82 Мука кормовая животного происхождения. Методы бактериологического анализа

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

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 ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. 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 термины и определения по ГОСТ Р 52816.

4 Обнаружение колиформных бактерий и определение количества методом наиболее вероятного числа (НВЧ)

Сущность метода — по ГОСТ Р 52816.

4.1 Метод обнаружения колиформных бактерий

4.1.1 В пробирку с селективно обогащенной питательной средой вносят около 1 г корма, пробирку помещают в термостат для инкубирования при температуре 30 °С или 37 °С (по договоренности) в течение 24 ч или 48 ч.

4.1.2 Пробирку, после выращивания по 4.1.1, проверяют на наличие помутнения и/или образования газа. Затем из пробирки, в которой установлено наличие помутнения и/или образования газа, вносят в другую пробирку с селективно обогащенной питательной средой около 1 $см^3$ суспензии и проводят повторное выращивание микроорганизмов при температуре 30 °С или 37 °С (по договоренности) в течение 24 ч или 48 ч.

4.1.3 Присутствие колиформных бактерий подтверждают в случае, если помутнение и/или образование газа замечено после осмотра пробирки, полученной по 4.1.2

4.2 Метод НВЧ — определение количества колиформных бактерий

4.2.1 В три пробирки с селективно обогащенной жидкой питательной средой двойной концентрации вводят определенное количество анализируемой пробы, если исходный корм является жидким, или определенное количество исходной суспензии в случае испытания других кормов.

4.2.2 В три пробирки с селективно обогащенной жидкой питательной средой нормальной концентрации вводят определенное количество анализируемой пробы, если исходный корм является жидким, или определенное количество исходной суспензии в случае испытания других кормов.

Затем, в таких же условиях, в дополнительные пробирки с питательной средой нормальной крепости вводят десятичные разбавления анализируемой пробы или исходной суспензии.

4.2.3 Пробирки с посевами, содержащие селективно обогащенную питательную среду двойной концентрации, выращивают при температуре 30 °С или 37 °С (по договоренности) в течение 24 ч, а пробирки, содержащие селективно обогащенную питательную среду нормальной концентрации, инкубируют 24 ч или 48 ч и после этого пробирки осматривают и отмечают образование пузырьков газа или помутнение, предотвращающее обнаружение формирования газа.

4.2.4 В ряд пробирок с подтверждающей питательной средой вводят суспензию культур из пробирок с селективно обогащенной питательной средой двойной концентрации и суспензию культур из пробирок с селективно обогащенной питательной средой нормальной концентрации, в которых было замечено образование пузырьков газа или помутнение.

4.2.5 Посевы в пробирках по 4.2.4 выращивают при температуре 30 °С или 37 °С в течение 24 ч или 48 ч, и эти пробирки исследуют на формирование газа.

4.2.6 Наиболее вероятное число колиформных бактерий в 1 $см^3$ или 1 г пробы корма (НВЧ) рассчитывают исходя из числа из пробирок по 4.2.5, показывающих формирование газа. В этом случае используют таблицу установления наиболее вероятного числа.

5 Среды выращивания бактерий и разбавители

5.1 Общие положения

Качество подготовки, изготовления и оценки эффективности питательных сред для выращивания бактерий — по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р ИСО 11133-1 и ГОСТ Р ИСО 11133-2.

5.2 Селективно обогащенная питательная среда: LST (Триптоза лаурилсульфата)

5.2.1 Состав приведен в таблице 1

Таблица 1

Наименование компонентов	a) Среда двойной концентрации	b) Среда нормальной концентрации
Энзиматический гидролизат молока и животных протеинов, г	40	20
Лактоза ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$), г	10	5
Дикалия гидрофосфат — (K_2HPO_4), г	5,5	2,75
Калия дигидрофосфат (KH_2PO_4), г	5,5	2,75
Хлорид натрия, г	10	5
Лаурилсульфат натрия, г	0,2	0,1
Вода, $см^3$	1000	1000

5.2.2 Приготовление

Различные компоненты или обезвоженную полную среду растворяют в воде, при необходимости ее нагревая.

При необходимости корректируют pH так, чтобы после стерилизации он был равен 6,8 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Питательную среду разливают по 10 $см^3$ в пробирки Дархама (поплавки) размером приблизительно 16 × 160 мм, когда используют среду нормальной концентрации, и в пробирки с размерами приблизительно 20 × 200 мм (не содержащие поплавки), когда используют среду двойной концентрации.

Стерилизуют среду в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Пробирки Дархама не должны содержать воздушные пузырьки после стерилизации.

5.2.3 Тестирование эффективности для обеспечения качества питательной среды

Определение селективности и продуктивности — по ИСО/ТУ 11133-1. Тестирование эффективности питательной среды LST (триптоза лаурилсульфата) приводится по ИСО/ТУ 11133-2 (таблица В.1).

5.3 Подтверждающая среда: лактозный желчный бульон с бриллиантовым зеленым

5.3.1 Состав приведен в таблице 2

Таблица 2

Ферментативный перевар казеина, г	10
Лактоза ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$), г	10
Обезвоженная желчь быка, г	20
Бриллиантовый зеленый (краситель), г	0,0133
Вода, $см^3$	1000

5.3.2 Приготовление

Компоненты или обезвоженную полную среду растворяют в воде, при необходимости производя нагрев.

При необходимости корректируют pH так, чтобы после стерилизации он был равен 7,2 ± 0,2 при температуре 25 °С.

Разливают и стерилизуют среду по 5.3.2.

5.3.3 Тестирование эффективности для обеспечения качества питательной среды

Определение селективности и продуктивности лактозного желчного бульона с бриллиантовым зеленым — по ГОСТ Р ИСО 11133-2 (таблица В.1).

6 Оборудование и стеклянная посуда

Используют обычное оборудование микробиологической лаборатории по ГОСТ Р ИСО 7218.

6.1 Оборудование для сухой (сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав).

6.2 Термостат, способный поддерживать температуру на уровне (30 ± 1) °С или (37 ± 1) °С.

6.3 Петля, изготовленная из платино-иридиевого или хромоникелевого сплава, диаметром приблизительно 3 мм, или петли одноразового пользования.

6.4 Пробирки, имеющие размеры приблизительно 16 × 160 мм и 20 × 200 мм.

6.5 Пробирки Дархама, с размерами, пригодными для использования в пробирках с размерами 16 × 160 мм (6.4).

6.6 Пипетки градуированные, вместимостью 1 $см^3$ и 10 $см^3$ — по ГОСТ 29227—91.

6.7 pH-метр с диапазоном измерений pH от 2 до 18, погрешность измерений ± 0,01 ед. pH при температуре 25 °С.

7 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с нормативным документом, подходящим для конкретного корма.

8 Приготовление анализируемой пробы

Анализируемую пробу подготовляют по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 25311 или другому нормативному документу, подходящему для конкретного корма.

9 Проведение испытания (см. приложение А)

9.1 Метод обнаружения (см. приложение А, рисунок А.1)

9.1.1 Подготовка анализируемой пробы и исходной суспензии

Подготовка анализируемой пробы — по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 25311 или другому нормативному документу, подходящему для конкретного корма.

9.1.2 Введение живых микроорганизмов в питательную среду (инокуляция) и их выращивание

9.1.2.1 В зависимости от требуемого предела обнаружения x, $см^3$, анализируемой пробы, если она представляет жидкий корм, или x, $см^3$, исходной суспензии, в случае исследования других кормов, переносят в пробирку, содержащую 10 $см^3$ селективно обогащенной питательной среды двойной концентрации [5.3.1 a)], когда 1 $см^3$ < x < 10 $см^3$, или в пробирку, содержащую 10 $см^3$ селективно обогащенной питательной среды нормальной концентрации [5.3.1 b)], когда $x \leq 1$ $см^3$.

9.1.2.2 Пробирку с питательной средой двойной концентрации (9.1.2.1) выдерживают в инкубаторе (6.2), установленном на температуру 30 °С или 37 °С (по договоренности), в течение (24 ± 2) ч.

9.1.2.3 Пробирку с питательной средой нормальной концентрации (9.1.2.1) выдерживают в термостате (6.2), установленном на температуру 30 °С или 37 °С (по договоренности), в течение (24 ± 2) ч или, если на данной стадии не наблюдается ни образование пузырьков газа, ни помутнение, предотвращающее обнаружение формирования газа, период инкубации продлевают еще на (24 ± 2) ч.

9.1.3 Подтверждение (см. приложение А, рисунок А.3)

9.1.3.1 Из пробирки, прошедшей инкубацию согласно 9.1.2.2, петлей (6.3) берут суспензию и вводят ее в пробирку с подтверждающей питательной средой (5.4). Выдерживают в термостате (6.2), установленном на температуру 30 °С или 37 °С (по договоренности), в течение (24 ± 2) ч, или, если на этой стадии образование пузырьков газа не наблюдается, в течение (48 ± 2) ч.

9.1.3.2 Аналогичную процедуру (описание которой дано в 9.1.3.1) выполняют для пробирок, прошедших инкубацию согласно 9.1.2.3 и показывающих образование пузырьков газа или помутнение, предотвращающее обнаружение формирования газа, когда один из этих двух признаков наблюдается впервые, то есть через (24 ± 2) ч или (48 ± 2) ч.

9.1.4 Интерпретация (см. приложение А, рисунок А.1)

Пробирку по 9.1.3.1 или 9.1.3.2, в которой наблюдается образование пузырьков газа через (24 ± 2) ч или (48 ± 2) ч, рассматривают как положительную.

9.2 Метод подсчета (НВЧ) (см. приложение А, рисунок А.2)

9.2.1 Подготовка анализируемой пробы, исходной суспензии и разбавление

Подготовка анализируемой пробы, исходной суспензии и разбавление — по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 25311 или нормативному документу, подходящему для анализируемого корма. Приготовляют достаточное число разбавлений, чтобы гарантировать, что все пробирки, соответствующие конечному разбавлению, дадут отрицательный результат (отсутствие помутнения).

9.2.2 Инокуляция и инкубация

9.2.2.1 Берут три пробирки для каждой серии разбавлений. Допускается для некоторых кормов и/или всякий раз, когда требуются результаты более высокой точности, инокуляция большего числа пробирок (например, пяти вместо трех). В этих случаях для вычисления методом наиболее вероятного числа следует обратиться к соответствующим таблицам в ГОСТ Р ИСО 7218.

9.2.2.2 Берут три пробирки с селективно обогащенной питательной средой двойной концентрации [5.3.1 a)]. Используя стерильную пипетку переносят в каждую из трех пробирок по 10 $см^3$ анализируемой пробы, если исследуемый корм жидкий, или по 10 $см^3$ исходной суспензии в случае исследования других кормов.

9.2.2.3 Затем берут три пробирки с селективно обогащенной питательной средой нормальной концентрации [5.3.1 b)]. Используя стерильную пипетку, переносят в каждую из трех пробирок по 1 $см^3$ анализируемой пробы, если исследуемый корм жидкий, или по 1 $см^3$ исходной суспензии в случае исследования других кормов.

9.2.2.4 Для каждого из последующих разбавлений продолжают действия согласно описанию в 9.2.2.3. Используют свежую стерильную пипетку для каждого разбавления. Введенную суспензию и питательную среду тщательно перемешивают.

9.2.2.5 Пробирки с питательной средой двойной концентрации (9.2.2.2) выдерживают в термостате при температуре 30 °С или 37 °С в течение (24 ± 2) ч.

9.2.2.6 Пробирки с питательной средой нормальной концентрации (9.2.2.3 и 9.2.2.4) выдерживают в термостате при температуре 30 °С или 37 °С в течение (24 ± 2) ч, или, если на этой стадии не обнаруживается ни образование пузырьков газа, ни помутнение, предотвращающее обнаружение формирования газа, инкубацию продолжают дополнительно в течение (24 ± 2) ч.

9.2.3 Подтверждение (см. приложение А, рисунок А.3)

9.2.3.1 Из каждой пробирки, прошедшей инкубацию согласно 9.2.2.5, петлей берут суспензию и вводят ее в пробирку с подтверждающей питательной средой (5.4). Выдерживают в термостате (6.2), установленном на температуру 30 °С или 37 °С (по договоренности), в течение (24 ± 2) ч, или, если на этой стадии образование пузырьков газа не наблюдается, инкубацию продолжают дополнительно в течение (24 ± 2) ч.

9.2.3.2 Процедуру, описанную в 9.2.3.1, выполняют с пробирками, прошедшими инкубацию согласно 9.2.2.6 и показывающими образование пузырьков газа или помутнение, предотвращающее обнаружение формирования газа, когда один из этих двух признаков наблюдается впервые, т.е. через (24 ± 2) ч или (48 ± 2) ч.

9.2.4 Интерпретация (см. приложение А, рисунок А.2)

Для каждого разбавления подсчитывают общее количество пробирок, в которых подтверждается образование пузырьков газа согласно 9.2.3 (положительные пробирки) через (24 ± 2) ч или (48 ± 2) ч (если инкубация продлевалась еще на сутки).

10 Обработка результатов

В соответствии с результатами интерпретации (см. 9.1.4) указывают присутствие или отсутствие колиформных бактерий в анализируемой пробе корма по ГОСТ Р ИСО 7218.

Вычисляют наиболее вероятное число из количества положительных пробирок на каждой стадии разбавления по ГОСТ Р ИСО 7218.

11 Сходимость результатов исследования

Установлено, что при использовании метода наиболее вероятного числа (НВЧ) может иметь место значительный разброс результатов. Доверительные пределы приведены в ГОСТ Р ИСО 7218.

12 Требования безопасности

Требования к безопасности выполнения работ и квалификации оператора — по ГОСТ Р ИСО 7218.

Приложение А
(обязательное)

А.1 Блок-схема метода обнаружения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) представлена на рисунке А.1

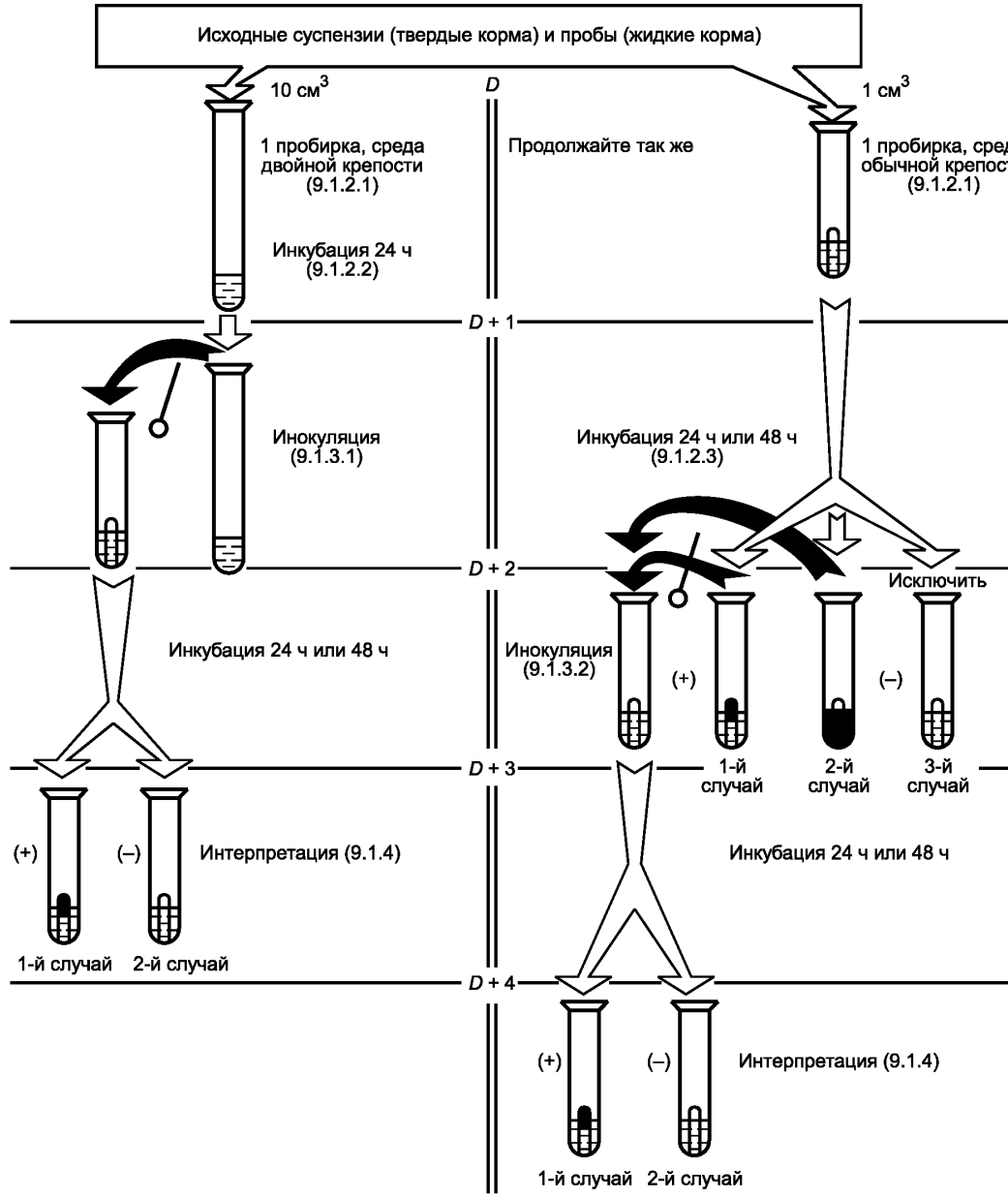

Рисунок А.1

А.2 Схема метода подсчета бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) представлена на рисунке А.2

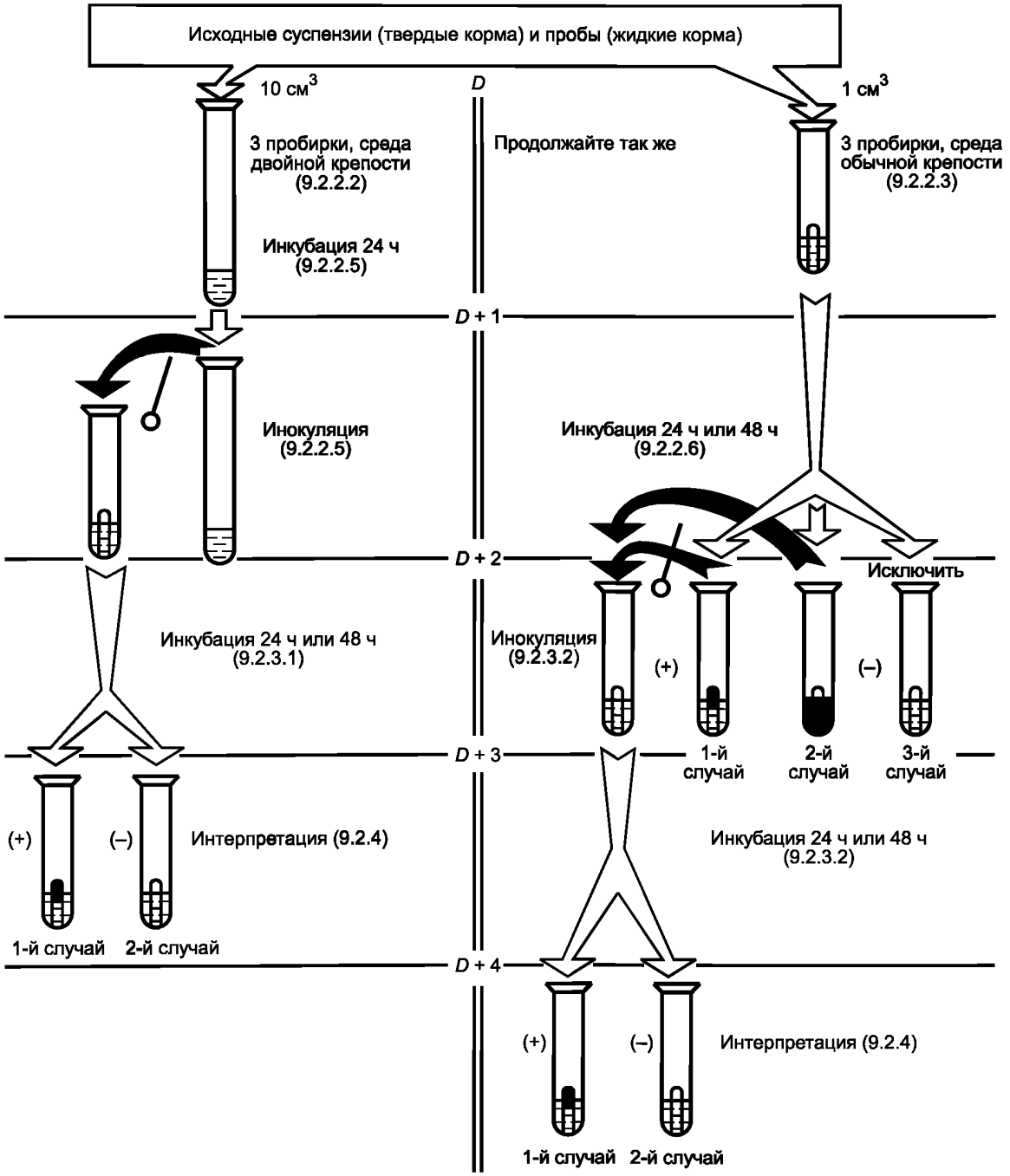

Рисунок А.2

А.3 Схема подробности стадии подтверждения обнаружения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) представлена на рисунке А.3

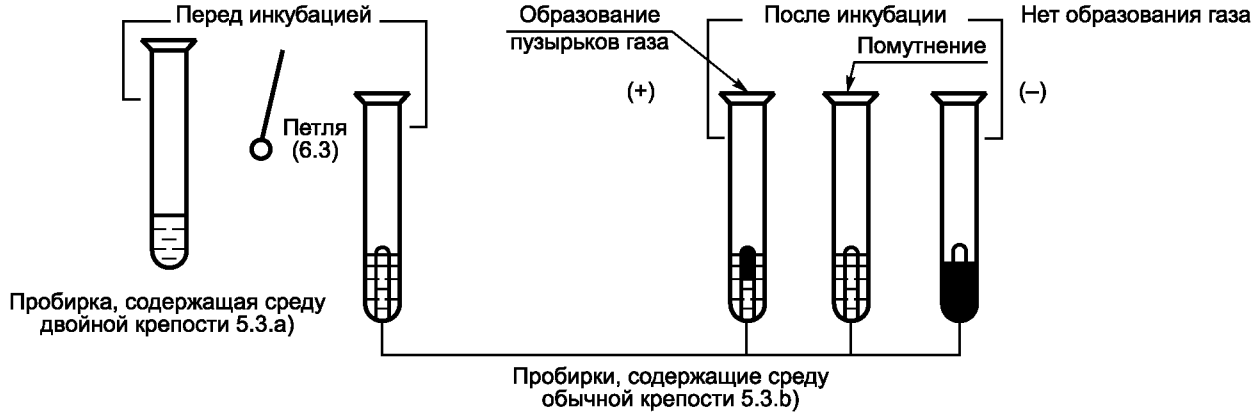

Рисунок А.3

УДК 663/664.777:006.354 ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: корма для животных, микробиология, метод обнаружения, метод подсчета (НВЧ) колиформных бактерий, питательные среды, лактозный желточный бульон с бриллиантовым зеленым, пробирки Дархама, помутнение, образование газа

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 07.10.2011. Подписано в печать 20.10.2011. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,05. Тираж 131 экз. Зак. 979.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru