ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54065— 2010

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ

Методы определения пробиотических микроорганизмов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

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 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 ноября 2010 г. № 701-ст

4 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, 2012

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

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ

Методы определения пробиотических микроорганизмов

Probiotics medicine remedies for animals. Methods for determination of the probiotics microorganisms

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на методы определения пробиотических микроорганизмов в пробиотических лекарственных средствах для животных, а также в микробиологических кормовых добавках, закваскаx и молочных сыворотках, вырабатываемых из отходов молочной промышленности, содержащих пробиотические микроорганизмы.

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 51758—2001 Среды питательные для ветеринарных целей. Методы биологических испытаний

ГОСТ Р 52684—2006 Средства лекарственные для животных. Правила приемки, методы отбора проб

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

ГОСТ 9225—84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа

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

ГОСТ 10444.11—89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10444.12—88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

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

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

ГОСТ 26670—91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 28805—90 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества осмотолерантных дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 30425—97 Консервы. Метод определения промышленной стерильности

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 информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по

Издание официальное

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.

3 Сущность метода

Метод основан на высеве определенных разведений пробиотических лекарственных средств для животных в полужидкие или на твердые агаризованные селективные питательные среды для глубинного и поверхностного культивирования посевов при оптимальных условиях для определения количества пробиотических микроорганизмов и их морфологических свойств.

Метод предназначен для установления соответствия микробиологических показателей качества пробиотических лекарственных средств для животных, микробиологических кормовых добавок, заквасок и молочных сывороток требованиям нормативной и технической документации.

4 Отбор проб и подготовка проб к анализу

4.1 Отбор проб проводят по ГОСТ Р 52684, ГОСТ 26669 и ГОСТ Р ИСО 7218.

4.2 От пробиотического лекарственного средства (микробиологической кормовой добавки, молочной сыворотки) отбирают навеску или определенный объем для приготовления разведений и высева в питательные среды. Масса или объем, предназначенные для посева в питательные среды и (или) для приготовления разведений, должны быть установлены в нормативном или техническом документе на конкретное лекарственное средство. Пробу для посева отбирают весовым или объемным методом непосредственно после вскрытия упаковки. Вскрытие проводят в асептических условиях стерильными инструментами.

4.3 Навеску (объем) лекарственного средства (микробиологической кормовой добавки, молочной сыворотки) отбирают так, чтобы в ней (в нем) были представлены все его компоненты в том же соотношении, что в анализируемой пробе.

4.4 Для приготовления разведений используют изотонический раствор хлорида натрия с массовой долей хлорида натрия 8,5 г/дм^3 (если не указано другого в нормативном документе на конкретное лекарственное средство, микробиологическую кормовую добавку, молочную сыворотку).

4.5 Соотношение между массой навески (объемом) лекарственного средства (микробиологической кормовой добавкой, молочной сывороткой) и объемом раствора натрия хлорида составляет:

1:9 — для 10-кратного разведения;

1:5 — для 6-кратного разведения;

1:3 — для 4-кратного разведения;

1:1 — для 2-кратного разведения.

4.6 Исходное разведение готовят одним из следующих способов:

растворением, разбавлением (для лекарственных средств, имеющих жидкую фазу), суспензированием порошков и лекарственных средств, имеющих пастообразную консистенцию.

4.7 Подготовка десятикратных разведений

4.7.1 Первое десятикратное разведение пробиотического лекарственного средства (микробиологической кормовой добавки, молочной сыворотки) является исходным, исходное разведение готовят в соответствии с 4.5.

Второе и последующие разведения готовят из одной доли предыдущего разведения и девяти долей раствора натрия хлорида путем смешивания в пробирке.

Если для перемешивания исходного разведения применяли пипетку, то этой же пипеткой вносят 1,0 (0,5) см^3 исходного разведения в 9,0 (4,5) см^3 раствора натрия хлорида, не касаясь пипеткой поверхности раствора. Полученное разведение перемешивают другой пипеткой путем многократного всасывания и выдувания содержимого пробирки. Интервал между приготовлением навесок препарата, их разведений и посева в питательные среды не должен превышать 30 мин.

Разведения готовят таким образом, чтобы можно было определить в 1 г (см3) лекарственного средства предполагаемое количество пробиотических микроорганизмов, указанное в нормативном документе на конкретный препарат.

5 Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения испытаний применяют аппаратуру, материалы, реактивы по ГОСТ 10444.1, ГОСТ 9225, ГОСТ 26669, а также:

- посуду мерную по ГОСТ 1770;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300;
- воду мясную по ГОСТ 20729.

Допускается применять другие средства измерения, оборудование, материалы и реактивы по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже указанных.

Инструменты и поверхность приборов, непосредственно соприкасающихся с испытуемыми образцами, должны быть простерилизованы одним из способов, указанных в ГОСТ 26668.

6 Подготовка к испытанию

6.1 Приготовление растворов реактивов и индикаторов

6.1.1 Приготовление раствора пероксида водорода с массовой долей 10 %

33,3 $см^3$ пероксида водорода с содержанием основного вещества 30 % (в случае, если пероксид водорода имеет другое содержание основного вещества, то делают пересчет) переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки.

6.1.2 Приготовление раствора HCl с массовой долей 5 %

11,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки.

6.1.3 Приготовление раствора натрия гидроксида с массовой долей 50 г/$дм^3$

5 г натрия гидроксида переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

6.1.4 Приготовление раствора с массовой долей теллурита калия 20 г/$дм^3$

2 г теллурита калия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки. Раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

6.1.5 Приготовление раствора с массовой долей метиленового синего 10 г/$дм^3$

1 г метиленового синего переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переносят к мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки.

Срок хранения раствора в закрытом сосуде из темного стекла при комнатной температуре — не более 3 мес.

6.1.6 Приготовление спиртового раствора бромтимолового синего с массовой долей 16 г/$дм^3$

1,6 г бромтимолового синего переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и растворяют в этиловом спирте с массовой долей 96 %. Раствор доводят этиловым спиртом до метки.

6.1.7 Приготовление раствора кристаллического фиолетового

2,0 г кристаллического фиолетового растворяют в 20 $см^3$ 95 %-ного раствора этанола.

0,8 г аммония оксалата ($C_2H_3NO_4$) растворяют в 80 $см^3$ дистиллированной воды.

Смешивают два раствора и оставляют смесь на 24 ч перед использованием.

6.1.8 Приготовление щелочного раствора бромкрезолового пурпурного с массовой долей 10 г/$дм^3$

1 г бромкрезолового пурпурного переносят в фарфоровую ступку с 19 $см^3$ раствора гидроокиси натрия с массовой долей 0,1 моль/$дм^3$ и после растворения добавляют 80 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора в закрытом сосуде из темного стекла при комнатной температуре — не более 3 мес.

6.1.9 Приготовление раствора с массовой долей натрия азида 100 г/$дм^3$

10 г натрия азида переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют при легком подогревании в дистиллированной воде и раствор доводят до метки. Раствор готовят под вытяжкой, так как пары натрия азида ядовиты.

6.1.10 Приготовление раствора генцианвиолета или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового с массовой долей 10 г/$дм^3$

1 г одной из анилиновых красок переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят дистиллированной водой до метки.

6.1.11 Приготовление реактивов для окраски по Граму (модификация Г.П. Калины) — по ГОСТ 9225 и ГОСТ 10444.1.

6.1.12 Приготовление раствора хлористого натрия — по ГОСТ 9225.

6.1.13 Приготовление щелочного раствора сорбиновой кислоты

1 г сорбиновой кислоты переносят, смывая раствором гидроокиси натрия (NaOH) концентрацией 1 моль/дм^3, в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки тем же раствором. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670. Допускается готовить раствор сорбиновой кислоты без фильтрации с соблюдением правил асептики, при этом раствор гидроокиси натрия готовят на стерильной дистиллированной воде.

6.1.14 Реактив для определения цитохромов готовят по ГОСТ 10444.11.

6.2 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода Lactobacillus

6.2.1 Приготовление жидкой и плотной среды Бликфельдта

Жидкую и плотную среду Бликфельдта готовят согласно ГОСТ 10444.1 или ГОСТ 10444.11.

6.2.2 Агаризованные среды из томатного сока готовят по ГОСТ 10444.1.

6.2.3 Среды МРС готовят по ГОСТ 10444.11.

6.2.3.1 Среда МРС жидкая

В мерную колбу вместимостью 1,0 дм^3 помещают 10 г пептона, 20 см^3 дрожжевого экстракта, 20,0 г глюкозы, 1,0 см^3 твина-80, 2,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного, 5,0 г натрия ацетата, 2,0 г триаммония цитрата, 0,2 г сульфата магния, 0,05 г сульфата марганца ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), доливают до метки мясную воду; растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С (6,2 ± 0,1).

Среду разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Пробирки с питательной средой хранят при температуре (4 ± 1) °С не более 30 сут.

6.2.3.2 Среда МРС агаризованная

Готовят, как среду МРС жидкую, с добавлением 15—18 г агар-агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят при температуре (4 ± 1) °С не более 30 сут.

При необходимости, для повышения селективности, после стерилизации к 1 дм^3 агаризованной или жидкой среды добавляют 1 см^3 щелочного раствора сорбиновой кислоты.

6.2.4 Капустный агар готовят по ГОСТ 10441.1.

6.2.5 Среды Рогоза готовят по ГОСТ 10444.11.

6.2.5.1 Среда Рогоза жидкая

В мерную колбу вместимостью 1,0 дм^3 помещают 10,0 г пептона, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 20,0 г глюкозы, 1,0 см^3 твина-80, 6,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 2,0 г цитрата аммония, 25,0 г ацетата натрия, 1,32 см^3 ледяной уксусной кислоты, 0,575 г сульфата магния, 0,12 г сульфата марганца ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$), 0,034 г сульфата железа. Затем в колбу доливают до метки дистиллированную воду, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С (5,4 ± 0,1). Среду разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Пробирки с питательной средой хранят при температуре (4 ± 1) °С не более 30 сут.

6.2.5.2 Среда Рогоза агаризованная

Среду Рогозы агаризованную готовят, как среду Рогоза жидкую, с добавлением 20,0 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Срок хранения готовой среды при температуре (4 ± 1) °С — не более 30 сут.

6.2.6 Гидролизованное молоко готовят по ГОСТ 10444.11.

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят или обрабатывают текучим паром в течение 30 мин и охлаждают при температуре (45 ± 2) °С. Доводят pH до (7,7 ± 0,1), добавляя водный раствор NaOH с массовой долей 40 %. К 1000 см^3 молока добавляют от 0,5 до 1,0 г порошка панкреатина. Затем к молоку добавляют от 5 до 6 см^3 хлороформа. Колбу закрывают и выдерживают при температуре (40 ± 2) °С в течение 18—24 ч. В течение первых 3—5 ч молоко два-три раза перемешивают (пробку после перемешивания приоткрывают для удаления хлороформа).

Затем гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, устанавливают pH (7,1 ± 0,1), добавляя водный раствор NaOH с массовой долей 40 %, и используют для приготовления агара с гидролизованным молоком.

В случае хранения гидролизованное молоко стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

6.2.7 Агар с гидролизованным молоком готовят по ГОСТ 10444.11.

К 1000 см^3 гидролизованного молока прибавляют 15 г агара. Среду нагревают до полного растворения агара и фильтруют через вату, разливают в пробирки или колбы, стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 10 мин.

6.3 Приготовление питательных сред для культивирования Bifidobacterium

6.3.1 Приготовление модифицированной печеночной среды Блаурокка

0,5 кг свежей говяжьей печени очищают от пленок и протоков, измельчают, заливают 1 дм^3 дистиллированной воды и кипятят в течение 1,5—2 ч. Отвар профильтровывают, доводят до 1 дм^3 дистиллированной водой.

Добавляют на 1 дм^3 раствора:

хлористого натрия — 5,0 г;

пептона — 10,0 г.

С помощью 10 %-ного раствора гидроокиси натрия устанавливают pH (8,15 ± 0,05). Кипятят 10 мин. Стерилизуют при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин или при температуре (112 ± 5) °С в течение (30 ± 1) мин. На следующий день печеночный бульон сливают, освободив от осадка, доливают дистиллированной водой до 1 дм^3. Вносят на 1 дм^3 бульона: глюкозы — 5,0 г, агара — 0,8 г, цистеина — 0,3 г. Кипятят 10 мин, доводят кислотность до (7,7 ± 0,1). Разливают в пробирки по 10 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 3) °С в течение (15 ± 1) мин или при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин.

Среду проверяют на стерильность путем выдержки при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 сут.

Срок хранения среды при температуре (20 ± 2) °С — не более 1 мес, при температуре (4 ± 2) °С — не более 2 мес.

Ростовые качества каждой серии среды Блаурокка контролируют высевом лиофилизированной биомассы бифидобактерий, при этом рост бифидобактерий должен проявиться не позднее чем через 48 ч при температуре (37 ± 1) °С.

6.3.2 Приготовление агаризованной кукурузно-лактозной среды

В небольшом объеме дистиллированной воды расплавляют агар-агар в количестве 2,5 г из расчета на 1 дм^3 приготовляемой среды. К остальному количеству дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 40 см^3 водного раствора кукурузного экстракта, разбавленного в соотношении 1:2, 6,6 г натрия лимоннокислого трехзамещенного, 0,12 г магния сернокислого, 2 г калия фосфорнокислого двузамещенного. Смесь нагревают до температуры (80 ± 2) °С, после чего соединяют с расплавленным агаром, добавляют 10 г лактозы и 0,15 г цистеина солянокислого или 0,5 г аскорбиновой кислоты. Цистеин предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, в которой устанавливают pH (8,45 ± 0,05) с помощью 10 %-ного раствора натрия гидроксида и нагревают на водяной бане до полного растворения. Всю смесь доливают горячей дистиллированной водой до 1 дм^3 и устанавливают pH (7,05 ± 0,05) с помощью 40 %-ного раствора натрия гидроксида.

Среду разливают в пробирки по 10 или 20 см^3 и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (30 ± 1) мин.

6.4 Приготовление питательных сред для культивирования молочнокислых стрептококков Streptococcus diacetilactis и Streptococcus thermophilus

6.4.1 Приготовление питательной среды М17

6.4.1.1 Основная среда: пептон — 2,0—2,5 г, перевар сои — 5,0 г, дрожжевой экстракт — 2,5 г, мясной экстракт — 5,0 г, глицерофосфат ($C_3H_7O_6PNa_2$) — 19,0 г, сернокислый магний ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) — 0,25 г, аскорбиновая кислота — 0,5 г, агар-агар — 9—18 г, дистиллированная вода — 950,0 см^3.

6.4.1.2 Раствор лактозы: лактоза — 10,0 г, дистиллированная вода — 100,0 см^3. Лактозу растворяют в воде, стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

6.4.1.3 Полная среда: основная среда — 95 см^3, раствор лактозы — 5 см^3. Непосредственно перед использованием расплавляют основную среду в водяной бане и охлаждают до 48 °С—50 °С. Подогревают раствор лактозы до 48 °С—50 °С. Добавляют раствор лактозы к основной среде и перемешивают.

Все компоненты растворяют в кипящей воде. Охлаждают до температуры 50 °С. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH был в пределах 7,1—7,2. Готовую среду разливают во флаконы, стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

6.4.2 Приготовление среды Lee

6.4.2.1 Основа среды

В мерную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 10,0 г пептона, 50 $см^3$ дрожжевого экстракта, 5,0 г лактозы, 3,0 г углекислого кальция, простерилизованного 0,5 г двухзамещенного фосфата натрия (Na_2HPO_4), 18 г агара, доливают дистиллированной водой до метки, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,0 ± 1) при температуре 25 °С. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин и при необходимости хранят при температуре (4 ± 1) °С не более 30 сут.

6.4.2.2 Для приготовления питательной среды к 10 $см^3$ основы добавляют 20 $см^3$ стерильного раствора бромкрезолового пурпурного массовой концентрацией 1 $г/дм^3$, перемешивают и разливают в чашки Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 1) °С — не более 7 сут.

6.5 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода Propionibacterium

6.5.1 Плотную кукурузно-лактозную среду готовят по 6.3.2.

6.5.2 Приготовление гидролизатно-молочной среды

Состав: агар —2,5 г; неомицин — 17,0 г; пептон — 20,0 г; натрий хлористый — 3,5 г; лактоза — 10,0 г; цистеин солянокислый — 0,15 г; гидролизованное молоко — 500 $см^3$; вода — 500 $см^3$.

Гидролизованное молоко готовят по ГОСТ 10444.1, затем разводят его водой в соотношении 1:1.

В небольшом количестве разведенного гидролизата расплавляют агар (в случае приготовления селективной среды с неомицином вносят 17 г неомицина на 1 $дм^3$). К остальному количеству гидролизата добавляют пептон и хлористый натрий, смесь нагревают до температуры (80 ± 2) °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. В смеси устанавливают pH (7,4 ± 0,1), кипятят в течение (15 ± 1) мин, дают отстояться, сливают с осадка, не фильтруя, доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема и добавляют в нее лактозу и солянокислый цистеин. Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 10 $см^3$ и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин с предварительным подогревом автоклава паром в течение (30 ± 1) мин, pH готовой среды — (7,1 ± 0,1).

6.5.3 Сывороточно-дрожжевая среда

Дрожжевой экстракт — 1 г или 100 $см^3$, молочная сыворотка — 5 г или 500 $см^3$, водопроводная вода — до 1000 $см^3$, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2 %, NaCl — 0,5 %, $CaCl_2$ — 0,004 %. После стерилизации pH — 6,5.

6.5.4 Среда для пропионовокислых бактерий

Лактат натрия 1 % (или 10 %-ной молочной кислоты 5 $см^3$ на 1000 $см^3$, pH 6,9, нейтрализуется NaOH), дрожжевого автолизата 1 %, пептона 2 %, NaCl 0,5 %, агара 1,5 %, pH 6,9. Стерилизуют под давлением. На чашку добавляют 0,5 $см^3$ 5 %-ного раствора сульфата натрия.

6.6 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода Pediococcus

6.6.1 Среду Бригс в модификации Шарп готовят по ГОСТ 10444.11.

В 875 $см^3$ дистиллированной воды вносят 15 г пептона, 20 г глюкозы, 25 $см^3$ дрожжевого экстракта, 5 г уксуснокислого натрия, 5 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 2 г аммония лимоннокислого, 100 $см^3$ томатного сока.

6.6.2 Агар Хоттингера готовят по ГОСТ Р 51758.

6.7 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода Bacillus

6.7.1 Мясо-пептонный агар готовят по ГОСТ 10444.1.

6.7.2 Приготовление среды Гаузе

Бульон Хоттингера по ГОСТ 10444.1 с содержанием аминного азота 700 мг — 30 $см^3$, пептон сухой — 5 г, натрий хлористый — 5 г, глюкоза — 10 г, агар микробиологический — 30 г, вода дистиллированная — до 1000 $см^3$.

Питательную среду разливают в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

6.8 Приготовление питательных сред для культивирования энтерококков Streptococcus faecalis и Streptococcus faecium

6.8.1 Приготовление селективного агара по Сланецу и Бертли

20,0 г пептона, 25,0 $см^3$ дрожжевого экстракта, 2,0 г глюкозы, 4,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного, (15,0 ± 3,0) г агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, доливают дистиллированной водой до метки, нагревают до растворения компонентов. Охлаждают, устанавливают pH

таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С (7,2 ± 0,1). Стерилизуют текучим паром при температуре 100 °С в течение 30 мин, охлаждают до 50 °С. Добавляют 4,0 см^3 раствора азида натрия и 10,0 см^3 раствора 2-,3-,5-трифенилтетразолий хлорида, хорошо перемешивают и разливают по чашкам Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

6.8.2 Канамицин азидно-эскулиновый агар (КАЭ-агар)

20,0 г пептона из казеина, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г натрия лимоннокислого, 0,5 г железа (III) — аммония гидроцитрата, 1,0 г эскулина, (15,0 ± 3,0) г агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доливают дистиллированной водой до метки. Растворяют составные части при нагревании, охлаждают, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации при температуре 25 °С он составлял (7,1 ± 0,1). Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин, охлаждают до 50 °С, добавляют 1,5 см^3 раствора азида натрия и 0,4 см^3 раствора канамицина сульфата массовой концентрацией 50 г/дм^3 или 0,2 см^3 раствора канамицина сульфата массовой концентрацией 100 г/дм^3 и разливают по чашкам Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

6.8.3 Щелочная полимиксиновая среда

6.8.3.1 Основа среды

К 400 см^3 мясо-пептонного бульона по ГОСТ 10444.1 добавляют 5 г натрия хлорида, 10 г глюкозы, 10 см^3 дрожжевого экстракта.

6.8.3.2 Основу среды стерилизуют при температуре (110 ± 1) °С в течение 12 мин, охлаждают и добавляют 250 см^3 раствора натрия карбоната массовой концентрацией 21,2 г/дм^3 и 250 см^3 раствора бикарбоната натрия массовой концентрацией 10 г/дм^3. Устанавливают pH таким образом, чтобы при температуре 25 °С он составлял (10,1 ± 0,1). После этого к среде добавляют 200000 ЕД полимиксина М сульфата, 5,0 см^3 спиртового раствора бромтимолового синего.

Непосредственно перед использованием среду разливают по 5 см^3 в стерильные пробирки. Растворы полимиксин В сульфата или полимиксин М сульфата готовят непосредственно перед использованием, для этого во флакон со стерильным антибиотиком вносят 5 или 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

Срок хранения среды в защищенном от света месте при температуре (4 ± 2) °С — не более 7 сут.

6.8.4 Молочно-ингибиторная среда (МИС)

К 850 см^3 расплавленного и охлажденного до 50 °С мясо-пептонного агара, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 150 см^3 обезжиренного молока, приготовленного по ГОСТ 10444.1, 12,5 см^3 раствора кристаллического фиолетового, 10,0 см^3 раствора калия теллурита массовой концентрацией 20 г/дм^3, 200000 ЕД полимиксина М сульфата.

Допускается взамен раствора калия теллурита добавлять в среду 5,0 см^3 раствора 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорида.

Среду не стерилизуют, разливают в стерильные чашки Петри.

Срок хранения среды при температуре (4 ± 2) °С — не более 10 сут.

6.9 Приготовление питательных сред для культивирования осмотолерантных дрожжей

6.9.1 Среду агаризованную для выделения дрожжей готовят по ГОСТ 28805.

15,0 г агара добавляют к 345 см^3 дистиллированной воды и оставляют на 30 мин для набухания агара. Затем расплавляют при нагревании и добавляют 20,0 г глюкозы, 25 см^3 дрожжевого экстракта. В полученной смеси при нагревании на водяной бане постепенно растворяют 610,0 г сахара-рафинада. После расплавления сахара смесь охлаждают до (50 ± 5) °С. Устанавливают pH среды таким образом, чтобы он составлял (5,8 ± 0,1) при температуре (25 ± 1) °С. Питательную среду разливают в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

6.9.2 Солодовое агаризованное сусло с сахарозой

К 500 см^3 солодового сусла, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 420,0 г сахара-рафинада, нагревая перемешивают до полного растворения, фильтруют, охлаждают до (50 ± 5) °С. Устанавливают с помощью молочной кислоты pH так, чтобы он составлял (3,6 ± 0,1) при температуре (25 ± 1) °С. Сусло с сахарозой разливают в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Приготовление агаризованного сусла: к 500 см^3 солодового сусла с pH (3,6 ± 0,1) добавляют 30,0 г агара, нагревают, при перемешивании расплавляют агар. Среду фильтруют и разливают в колбы, затем стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Непосредственно перед посевом агаризованное сусло расплавляют на водяной бане, а сусло нагревают сахарозой до температуры (50 ± 5) °С и две эти части смешивают. Питательную среду разливают в колбы и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

6.9.3 Среду Сабуро готовят по ГОСТ 10444.12.

На 1 дм^3 дистиллированной воды — 10,0 г пептона, 18,0 г агар-агара. Нагревают до расплавления агара, добавляют 40,0 г глюкозы, pH 5,8, стерилизуют при избыточном давлении 0,5 атм при температуре 116 °С в течение 30 мин.

6.9.4 Среды для определения псевдокаталазы готовят по ГОСТ 10444.11.

6.10 Приготовленные питательные среды должны иметь маркировку с указанием названия среды, даты изготовления и (или) даты истечения срока годности.

6.11 Для проведения испытаний допускается использовать готовые питательные среды промышленного отечественного и импортного производства в соответствии с инструкциями по их применению, а также оригинальные питательные среды, разработанные организацией — производителем пробиотических лекарственных средств для животных (микробиологических кормовых добавок, молочных сывороток).

6.12 Приготовленные питательные среды хранят в течение срока годности в холодильнике при температуре от 0 °С до 10 °С. Подсохшие питательные среды не используют. Перед использованием температуру питательной среды доводят до комнатной.

7 Подготовка питательных сред перед использованием

7.1 Питательные среды расплавляют на кипящей водяной бане или другим способом, который дает аналогичный результат (например, текучим паром в автоклаве). Избегают перегрева среды и удаляют ее сразу же после расплавления. Перед использованием питательную среду содержат в расплавленном состоянии на водяной бане с терморегулятором при температуре (47 ± 2) °С.

Сохраняют расплавленную питательную среду не более 8 ч. Не использованную до конца среду после ее затвердения не применяют.

7.2 При необходимости деаэрирования питательных сред непосредственно перед использованием их прогревают в течение 15 мин на кипящей водяной бане.

7.3 Агаризованные питательные среды разливают в чашки Петри с толщиной слоя питательной среды не менее 2 мм (например, для чашек диаметром 90 мм обычно требуется 12 см^3 агаровой среды) и после застывания подсушивают. При подсушивании для удаления влаги с поверхности среды чашки переворачивают вверх дном и выдерживают в течение 30 мин при температуре 48 °С—50 °С или в ламинарном боксе в течение 1—2 ч, или в других условиях, обеспечивающих испарение конденсационной влаги и исключающих микробное загрязнение. Приготовленные таким образом чашки Петри используют немедленно или хранят при условиях, предупреждающих изменение их состава, т. е. в темноте и в холодильнике, не более одной недели. Этот срок может быть удлинен или сокращен согласно требованиям, установленным стандартом на конкретный метод испытания.

8 Методы посева на питательные среды

8.1 Поверхностный метод посева на плотные среды

8.1.1 На подсушенную питательную среду, подготовленную по 7.3, наносят жидкий препарат или разведение навески и немедленно равномерно растирают по поверхности с помощью стерильного стеклянного или пластикового шпателя. Посев проводят параллельно в две чашки Петри.

8.1.2 Засеянную поверхность подсушивают, выдерживая чашки в горизонтальном положении в течение 15 мин, и помещают в термостат, установленный на соответствующую температуру (кроме особо оговоренных случаев). Если наблюдается чрезмерное обезвоживание среды (например, при 55 °С или вследствие интенсивной циркуляции воздуха), чашки перед термостатированием неплотно укладывают в пластиковый пакет или аналогичное приспособление с тем же эффектом. В период термостатирования допускаются кратковременные колебания температуры, например во время таких обычных операций, как загрузка или разгрузка термостата.

8.1.3 В посевах на агаризованных средах для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов, бактерий рода Lactobacillus, Pediococcus стрептококков группы N рода Streptococcus, S.thermophilus ограничение доступа кислорода осуществляют методом, изложенным в ГОСТ 30425, или одним из указанных ниже способов:

- на застывшую питательную среду в чашках Петри наливают второй слой расплавленной и охлажденной до (45 ± 1) °С агаризованной среды в количестве 5,0 см^3 и оставляют до затвердения;

- чашки Петри помещают в газовую среду, состоящую из 95 % газообразного азота и 5 % углекислого газа;

- чашки Петри помещают в анаэростат, аппарат закрывают, с помощью вакуумного насоса создают вакуум 86,6—93,3 кПа;

- в каждую пробирку с жидкой средой добавляют стерильный жидкий парафин в количестве, необходимом для получения столба высотой около 2 см.

Чашки следует анализировать непосредственно после термостатирования. В других случаях, кроме особо оговоренных, их хранят не более 24 ч в холодильнике.

8.2 Глубинный метод посева в плотные среды

8.2.1 Жидкий препарат или разведение навески вносят параллельно в две чашки Петри и заливают не позднее чем через 15 мин расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С питательной средой. Высота слоя питательной среды должна быть 4—5 мм.

8.2.2 Среду немедленно равномерно перемешивают с посевным материалом круговыми движениями чашки так, чтобы среда не вытекала из чашки и не загрязняла крышку. После застывания среды чашки с посевами вверх дном помещают в термостат.

8.3 Глубинный метод посева в полужидкие питательные среды

8.3.1 Готовят два ряда пробирок, содержащих полужидкую питательную среду (по 10 $см^3$ в пробирке) для высева в них соответствующих разведений исследуемого препарата. Внесение посевного материала в питательную среду начинают с последнего разведения, внося в последнюю пробирку каждого из двух рядов питательной среды по 1 $см^3$ последнего разведения препарата, затем таким же образом вносят по 1 $см^3$ предыдущих разведений. При внесении разведений в питательную среду проводят тщательное перемешивание пипеткой, а затем круговыми движениями руки или с помощью шуттель-аппарата. Для каждого посева берут новую стерильную пипетку.

9 Методы идентификации пробиотических микроорганизмов

9.1 Окрашивание по Граму (модифицированный метод Хаккера) проводят по ГОСТ Р ИСО 7218.

Это окрашивание бактериальных клеток позволяет описать морфологию бактерий и классифицировать их на две группы на основании способности образовывать в условиях испытания фиолетовое окрашивание с кристаллическим фиолетовым.

Растворы и реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

9.1.1 Техника окрашивания

После фиксации на предметном стекле бактериальной пленки из 18—24-часовой культуры заливают пленку раствором кристаллического фиолетового и оставляют на 1 мин для протекания реакции.

Стекло в наклонном положении осторожно промывают несколько секунд водой. Наносят на стекло раствор йода и оставляют на 1 мин для протекания реакции. Стекло в наклонном положении осторожно промывают несколько секунд водой. Стекло в наклонном положении осторожно и непрерывно промывают этанолом (95 %) в течение не более 30 с до прекращения вымывания фиолетового красителя. Стекло в наклонном положении осторожно промывают водой для удаления этанола. Наносят на стекло раствор сафранина и оставляют на 10 с. Стекло в наклонном положении осторожно промывают водой. Высушивают стекло.

9.1.2 Оценка результатов

Стекло просматривают под микроскопом, используя для этого светосильный объектив с масляной иммерсией. Бактериальные клетки, окрашенные в синий или фиолетовый цвет, относят к грамположительным (Грам+); другие, окрашенные в цвета от темно-розового до красного, относят к грамотрицательным (Грам-).

У чистых культур некоторых типов бактерий в поле микроскопа могут присутствовать как грамположительные, так и грамотрицательные клетки.

9.2 Проба на каталазу

Обнаружение этого фермента, который разлагает перекись водорода (H_2O_2) на воду и кислород, проводят, используя бульонную культуру или отдельную колонию на агаровой среде. Если в конкретных стандартах на методы испытаний не установлены другие требования, то во всех случаях питательная среда не должна содержать кровь. Исключение составляет кровь, подвергшаяся термической обработке (среда с вареной кровью). В случае анаэробных бактерий перед добавлением перекиси водорода культуру выдерживают 30 с на открытом воздухе.

9.2.1 Проба на каталазу с колонией

На предметное стекло наносят отдельно две капли раствора перекиси водорода с массовой долей 3 % (1:10 по объему). Отделяют колонию от среды стерильным стеклом или пластиковой палочкой (но не металлической иглой) и осторожно диспергируют ее в одной из капель. Немедленно, а также через несколько минут (но не менее 1 мин) отмечают отсутствие или образование пузырьков кислорода. В сомнительном случае покрывают обе капли предметным стеклом и сравнивают наличие пузырьков в обеих каплях. Наблюдения проводят визуально или с помощью микроскопа при малом увеличении.

9.3 Бензидиновый тест

При определении молочнокислых микроорганизмов или бактерий рода Pediococcus в случае, если в характерных колониях обнаружены грамположительные, неподвижные микроорганизмы, дающие положительную реакцию на каталазу, контролируют отсутствие цитохромов путем постановки бензидинового теста.

Для этого выросшие на чашках Петри в течение 24—48 ч колонии бактерий заливают раствором бензидина, приготовленного по 6.1.14. После того, как раствор пропитает колонии, в чашку Петри заливают такой же объем 5 %-ной перекиси водорода. Молочнокислые микроорганизмы, в том числе бактерии рода Pediococcus, не содержат цитохромов. В случае присутствия цитохромов колонии окрашиваются в голубовато-зеленый или ярко-голубой цвет.

9.4 Проба на псевдокаталазу

Наличие псевдокаталазы проводят на среде по 6.9.4 с содержанием глюкозы 0,05 %. Посевы инкубируют не более 5 сут при температуре (30 ± 1) °С или не более 3 сут при температуре (37 ± 1) °С. Определение псевдокаталазы проводят по ГОСТ 30425.

10 Методы определения пробиотических микроорганизмов

10.1 Метод определения бактерий рода Bifidobacterium

Для выявления бактерий рода Bifidobacterium в исследуемом препарате необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают методом глубинного посева в полужидкие питательные среды в соответствии с 8.3 или методом глубинного посева в плотные питательные среды в соответствии с 8.2. Посевы инкубируют не более трех суток при температуре (37 ± 1) °С.

Подсчет колоний проводят через 24—48 ч. После инкубирования посевов их просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Bifidobacterium, затем проводят подсчет выросших колоний.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму по 9.1 и определяют наличие каталазы по 9.2.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода Bifidobacterium обнаружены грамположительные мелкозернистые слегка изогнутые с бифуркацией на концах или без нее, расположенные одиночно, группами, иногда цепочками, палисадом, не образующие спор и капсул, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Bifidobacterium.

10.2 Метод определения бактерий рода Lactobacillus

Для выявления бактерий рода Lactobacillus в исследуемом препарате необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают на поверхность предварительно подсушенной агаризованной питательной среды, приготовленной по разделу 7 методом глубинного посева, изложенным в 8.1.4, в агаризованные питательные среды, указанные в 6.2. Посевы инкубируют не более трех суток при температуре (37 ± 1) °С. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Lactobacillus.

Подсчет колоний проводят через 48—72 ч. Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1, наличие каталазы определяют по 9.2.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода Lactobacillus обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Lactobacillus.

10.3 Метод определения молочнокислых стрептококков Streptococcus diacetilactis и Streptococcus thermophilus

Для выявления молочнокислых стрептококков Streptococcus diacetilactis, Streptococcus thermophilus необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают глубинным методом по 8.2 в одну из агаризованных сред, указанных в 6.8.

Засеянные чашки после застывания агара переворачивают и помещают в термостат. Посевы для определения Streptococcus diacetilactis инкубируют при температуре (37 ± 1) °С не более трех суток, для определения Streptococcus thermophilus посевы инкубируют (48 ± 3) ч при температуре (45 ± 1) °С. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для молочнокислых стрептококков, затем проводят подсчет выросших колоний. Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1, наличие каталазы определяют по 9.2.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении молочнокислых стрептококков Streptococcus diacetilactis и Streptococcus thermophilus обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с pH 9,6 и 6,5 % NaCl кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Streptococcus.

10.4 Метод определения бактерий рода Propionibacterium

Для выявления бактерий рода Propionibacterium в исследуемом препарате необходимое разведение, приготовленное согласно разделу 4, высевают глубинным методом на одну из питательных сред, указанных в 6.5.

Посевы для определения бактерий рода Propionibacterium инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, подсчет колоний проводят через 24—27 ч.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Propionibacterium. Характеристика колоний приведена в приложении А.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода Propionibacterium обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные палочки, располагающиеся поодиночке, парами, в виде букв V или Y, короткими цепочками или группами в виде «китайских иероглифов», то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Propionibacterium.

10.5 Метод определения бактерий рода Pediococcus

Для выявления присутствия бактерий рода Pediococcus в исследуемом препарате необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают глубинным методом по 8.2 в агаризованную среду, указанную в 6.6.

Посевы инкубируют не более трех суток при температуре (37 ± 1) °С. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Pediococcus, затем проводят подсчет выросших колоний.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1, наличие каталазы определяют по 9.2, наличие псевдокаталазы — по 9.4.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода Pediococcus обнаружены грамположительные неспорообразующие, располагающиеся парами и тетрадами, неподвижные каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Pediococcus.

10.6 Метод определения бактерий рода Bacillus

Для выявления бактерий рода Bacillus в исследуемом препарате необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают на поверхность предварительно подсушенной агаризованной питательной среды, приготовленной по 6.7. Посевы инкубируют в течение 18—24 ч при температуре (37 ± 1) °С. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Bacillus, затем проводят подсчет выросших колоний.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1, наличие каталазы определяют по 9.2.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода Bacillus обнаружены спорообразующие, грамположительные, подвижные, каталазоположительные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Bacillus.

10.7 Метод определения бактерий рода энтерококков Streptococcus faecalis и Streptococcus faecium

Для выявления энтерококков в исследуемом препарате необходимое разведение, подготовленное согласно разделу 4, высевают на поверхность предварительно подсушенной агаризованной питательной среды, приготовленной по 6.8.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—27 ч. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний характерных для энтерококков, затем проводят подсчет выросших колоний.

Для подсчета отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150, характерных для энтерококков колоний.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.1, наличие каталазы определяют по 9.2.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных и морфологических свойств микроорганизмов обнаружены грамположительные, расположенные парами, короткими или длинными цепочками, не образующие каталазу кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относят к энтерококкам.

10.8 Метод определения дрожжей семейства Saccharomyces

Для выявления дрожжей в исследуемом препарате необходимое разведение препарата, подготовленное согласно разделу 4, высевают поверхностным методом по 8.1 на агаризованную среду, указанную в 6.9.

Посевы инкубируют в течение семи суток при температуре (30 ± 1) °С. После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для дрожжей семейства Saccharomyces, затем проводят подсчет выросших колоний.

Рост дрожжей на агаризованных питательных средах сопровождается образованием выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Если при изучении культуральных и морфологических свойств при определении дрожжей обнаружены клетки овальные или слегка эллипсовидные, грамположительные, неподвижные, не образующие капсул, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относят к дрожжам.

11 Учет результатов

Для качественного определения пробиотических микроорганизмов в лекарственном средстве для животных, микробиологической кормовой добавке, закваске или молочной сыворотке результат выражают следующим образом:

- если искомые бактерии обнаружены: «обнаружен» — при этом указывают род микроорганизма и разведение исследуемого лекарственного средства (микробиологической кормовой добавки, закваски, молочной сыворотки);

- если искомые микроорганизмы отсутствуют: «не обнаружен» — при этом указывают род микроорганизма и разведение исследуемого лекарственного средства (микробиологической кормовой добавки, закваски, молочной сыворотки).

Количественно пробиотические микроорганизмы в лекарственном средстве для животных, микробиологической кормовой добавке, закваске, молочной сыворотке X_1 рассчитывают по каждому разведению отдельно по формуле

$$X_1 = \frac{NP}{V},$$

где X_1 — количество пробиотических микроорганизмов;

N — среднеарифметическое числа колоний, выросших на чашках Петри из одного разведения;

V — объем разведения, использованного для проведения испытания, $см^3$;

P — выбранное разведение.

Далее результаты подсчета, полученные по каждому разведению, суммируют, делят на количество разведений и получают конечный результат — количество пробиотических микроорганизмов в 1 г ($см^3$) пробиотического лекарственного средства, микробиологической кормовой добавки, закваски или молочной сыворотки.

Приложение А
(справочное)

Характеристика колоний пробиотических микроорганизмов на агаризованных средах и характер роста на жидких средах

А.1 Характеристика колоний пробиотических микроорганизмов на агаризованных средах и характер роста на жидких средах приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Микроорганизмы	Питательная среда	Характеристика колоний или характер роста на жидкой среде
Молочнокислые бактерии рода Lactobacillus	Среда Бликфельдта жидкая	Изменение цвета среды от фиолетового до желтого, помутнение среды или образование осадка, возможно выделение газа
	Среда Бликфельдта агаризованная, среда из томатного сока	Колонии мелкие, гладкие или шероховатые
	Капустный агар	Мелкие колонии, окружены прозрачной зоной
	Рогоза, MRS-агар, ГМС, агар с гидролизованным молоком	Колонии могут быть мелкие, гладкие или зернистые, плоские или слегка выпуклые, бесцветные или слабо пигментированные, диаметром 1—3 мм. При глубинном посеве колонии могут быть в форме «птичек», «лодочек»
	MRS-бульон, Рогоза жидкая	Помутнение среды, образование осадка, пристеночный рост
Бактерии рода Bifidobacterium	Среда Блаурокка, кукурузно-лактозный агар	Колонии от белого и серого до темно-коричневого цвета, в виде крупинок, гречишного зерна или дисков, иногда кометоили гвоздикообразные
Молочнокислые стрептококки (S.diacetilactis, S. thermophilus)	М-17	Чечевицеобразные колонии диаметром 1—2 мм
	Среда Lee	Колонии желтые, круглые или эллипсовидные, вокруг которых наблюдаются зоны просветления
Бактерии рода Propionibacterium	Кукурузно-лактозная среда, ГМС, сывороточно-дрожжевая среда	На жидких средах — помутнение бульона и образование зачастую окрашенного осадка. На плотных средах — мелкие, выпуклые полупрозрачные блестящие колонии белого, серого, розового, красного, желтого или оранжевого цвета
Бактерии рода Pediococcus	Среда Бригс в модификации Шарп	Колонии мелкие, гладкие или шероховатые
Бактерии рода Bacillus	МПА, среда Гаузе	Матовые колонии от беловато-бежевого и серого до желтого цвета с волнистыми (изрезанными, расползающимися) краями, слегка врастающими в агар, сухие или вязкой консистенции, могут образовать до 50 % гладких, блестящих, круглых колоний или колоний неправильной формы
Энтерококки (S.faecium, S. faecalis)	Агар Сланец—Бертли, щелочная полимиксиновая среда, молочно-ингибиторная среда, канамицин азидно-эскулиновый агар	Красные или темно-бордовые колонии. Помутнение и изменение цвета среды. Типичные колонии энтерококков имеют округлую форму, ровные края, блестящую поверхность, диаметр 1,5—2,0 мм. На средах разного состава колонии могут иметь окраску от черного и серого цвета до красного, с зоной протеолиза
Дрожжи	Среда агаризованная для выделения дрожжей по ГОСТ 28805; солодовое агаризованное сусло с сахарозой, агар Сабуро	Крупные, выпуклые, блестящие, серовато-белые колонии с гладкой поверхностью и ровным краем

УДК 619:615.355:636.087.8:006.354 ОКС 07.100.30 65.120 С09

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, пробиотические лекарственные средства для животных, микробиологические кормовые добавки, закваски, молочные сыворотки, методы определения, методы идентификации

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 09.12.2011. Подписано в печать 16.01.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90. Тираж 138 экз. Зак. 62.

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