ГОСТ Р 51426—99
(ИСО 6887—83)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ. КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН творческим коллективом с участием представителей Технического комитета по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 581-ст

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 6887—83 «Микробиология. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований», за исключением наименования, 1, 2, 7

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Госстандарта России

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МИКРОБИОЛОГИЯ. КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований

Microbiology. Feedstuffs, compound feeds, feed raw materials.
General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма, комбикормовое сырье и представляет собой общее руководство по приготовлению разведений для выявления наличия (отсутствия) или определения количества аэробных микроорганизмов (в настоящее время руководство должно использоваться в сочетании с методами, описанными в «Правилах бактериологического исследования кормов»).

Обязательные требования к порядку проведения разведений изложены в разделе 9.

2 Нормативные ссылки

ГОСТ 13496.0—80* Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ Р 51419—99 (ИСО 6498—98) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб

3 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

исходная суспензия (первичное разведение): Суспензия, раствор или эмульсия, полученные после того, как взвешенное или измеренное количество исследуемого продукта было смешано, если это необходимо, с использованием смесителя и соблюдением соответствующих предосторожностей (см. примечание к 9) с девятикратным количеством жидкости для разведения (разбавитель см. 5) так, чтобы крупные частицы, если они есть, могли осесть.

Примечание — В некоторых случаях, в особенности для продуктов, у которых исходная 1 + 9 суспензия слишком вязкая или слишком густая, необходимо прибавить больше разбавителя. Это следует учитывать в последующих действиях и при представлении результатов;

дальнейшие десятикратные разведения: Суспензии или растворы, полученные путем смешивания определенного объема исходной суспензии с девятикратным объемом разбавителя и повторения этой процедуры до тех пор, пока не будет получена серия десятикратных разведений, пригодных для инокуляции культуральной среды;

специальный стандарт: Стандарт или официальное руководство, описывающие исследование конкретного продукта (или группы продуктов) на идентификацию или количественный подсчет определенного микроорганизма (или группы микроорганизмов) и описывающие особенности отбора и приготовления испытуемых проб.

* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе ИСО 6497 [1].

Издание официальное

4 Сущность метода

Сущность метода заключается в приготовлении исходной суспензии с равномерным, насколько это возможно для испытуемой пробы, распределением микроорганизмов. При необходимости, для того, чтобы снизить количество микроорганизмов на единицу объема и сделать возможным после инкубации наблюдение за их ростом или подсчет колоний, готовят десятикратные разведения.

Приемлемое количество микроорганизмов обычно составляет:

- для наиболее вероятного метода подсчета с использованием трех пробирок: 1 микроорганизм в 10 $см^3$ самого высокого десятикратного разведения;
- для метода подсчета колоний: от 30 до 300 колоний (для некоторых групп, например, колиформ от 15 до 150 колоний).

5 Разбавитель

5.1 Чтобы добиться воспроизводимости результатов, для приготовления разбавителя следует использовать обезвоженные основные компоненты или обезвоженный полноценный препарат.

Следует строго соблюдать инструкции изготовителя.

Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

Используемая вода должна быть дистиллированной в стеклянном аппарате или деионизированной.

5.2 Состав

Если нет неопровержимых доказательств (например, авторитетных данных или сравнительных опытов), что другие разбавители более приемлемы для данных продуктов, то следует использовать разбавитель следующего состава: 1,0 г пептона, 8,5 г хлористого натрия, 1 $дм^3$ воды.

5.3 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, если это необходимо, с подогревом.

pH разбавителя после стерилизации должен быть равен 7,0 при 25 °С.

5.4 Распределение разбавителя

Разбавитель помещают в пробирки, колбы или флаконы соответствующей вместимости в таком количестве, чтобы после стерилизации каждая из них содержала 9 $см^3$ разбавителя или объем, кратный 9 $см^3$ (для десятикратных разведений), или 90 $см^3$ разбавителя, или объем, кратный 90 $см^3$ (для исходной суспензии). В случае нежидких продуктов см. 9.1.2. Закрывают пробирки, колбы или флаконы пробками.

Пробирки, колбы или флаконы с разбавителем стерилизуют в автоклаве при (121±1) °С в течение 20 мин.

Если разбавитель не используют сразу, его следует хранить в темноте при температуре от 0 до 5 °С не более одного месяца в условиях, не допускающих никаких изменений в его объеме или составе.

Примечание — При подсчете нескольких групп микроорганизмов, нуждающихся в различных культуральных средах, необходимо распределить все разведения (или некоторые из них) в количествах, превышающих 9 $см^3$. Вместимость пробирок, колб или флаконов должна быть соответственно указана.

6 Оборудование

Для проведения испытаний применяют обычное микробиологическое оборудование.

6.1 Прибор для сухой или влажной стерилизации (печь или автоклав, работающий отдельно или как часть прибора для приготовления и распределения сред).

Прибор, который будет входить в контакт с разбавителем, пробой или разведениями, кроме оборудования, которое поставляют стерильным (пластиковые чашки, пластиковые пипетки и т.д.), следует стерилизовать по одному из следующих методов:

- путем выдерживания в печи при 170 — 175 °С в течение 1 ч;
- путем выдерживания в автоклаве при (121±1) °С в течение 20 мин.

6.2 Оборудование для встряхивания (для нежидких продуктов см. 9.1.2).

Допускается использовать один из следующих приборов:

- вращательный встряхиватель, устойчивый к условиям стерилизации, работающий частотой вращения от 8000 до 45000 об/мин со стеклянными или металлическими резервуарами, снабженными крышечками;
- встряхиватель перистальтического типа (стомахер) со стерильными пластиковыми емкостями.

Примечание — Резервуары или пластиковые емкости должны быть достаточной вместимости, позволяющей пробе эффективно перемешиваться с достаточным количеством разбавителя. Как правило, вместимость контейнера должна в два раза превышать объем пробы плюс разбавитель.

6.3 Смеситель, способный перемешивать 1 или 2 $см^3$ пробы (в случае жидких продуктов) или ее более высокое разведение в пробирке соответствующей вместимости с 9 или 18 $см^3$ разбавителя для получения гомогенной суспензии, работающий по принципу эксцентрического вращения содержимого пробирки (смеситель Вортекса).

6.4 Колбы или флаконы вместимостью, достаточной для того, чтобы поместить 90 $см^3$ разбавителя, используемого для приготовления исходной суспензии, или количество, кратное 90 $см^3$ (для нежидких продуктов см. 9.1.2).

6.5 Пробирки (колбы или флаконы) вместимостью, достаточной для того, чтобы поместить и оставить сверху пространство, необходимое для перемешивания 10 $см^3$ (или количества, кратного 10 $см^3$) пробы жидкого продукта или исходной суспензии, или дальнейших десятикратных разведений.

6.6 Пипетки мерные вместимостью 1 и 2 $см^3$, имеющие выпускное отверстие диаметром от 2 до 3 мм, закрытые ватой.

6.7 Градуированные пипетки вместимостью от 10 до 20 $см^3$, закрытые ватой.

6.8 pH-метр с погрешностью измерения ±0,1 pH.

6.9 Весы аналитические с точностью взвешивания до 0,01 г.

Примечание — Допускается использовать другое оборудование с такими же или более высокими метрологическими характеристиками. Стеклянная посуда должна быть пригодной к повторной стерилизации и быть химически инертной.

7 Отбор проб

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

8 Подготовка испытуемых проб

8.1 Подготовка испытуемых проб — по ГОСТ Р 51419.

9 Порядок проведения разведений

9.1 Испытуемая проба и исходная суспензия (первичное разведение)

Методику, описанную в 9.1.1, используют в следующих случаях:

- для невязких жидких продуктов (вода, молоко и т.д.), в которых распределение микроорганизмов гомогенное или легко делается гомогенным механическим путем (встряхивание и т.д.);
- для жидкой части гетерогенной смеси, которая считается достаточно представительной для всей пробы (например, водная фаза животных или растительных жиров).

Для всех других продуктов используют методику, описанную в 9.1.2.

Чтобы избежать повреждения микроорганизмов в результате внезапных изменений температуры, температура разбавителя в течение всего испытания должна быть приблизительно такой же, как у испытуемой пробы.

9.1.1 Жидкие продукты (которые можно отбирать пипетками)

Встряхивают испытуемую пробу в руке, производя 25 движений вверх и вниз с амплитудой около 30 см за 7 с. Чтобы добиться равномерного распределения микроорганизмов, лучше использовать стандартное механическое устройство. Пипеткой отбирают 1 $см^3$ исследуемой пробы и вносят его в 9 $см^3$ разбавителя, избегая контакта пипетки с разбавителем.

Осторожно смешивают исследуемую порцию с разбавителем путем десятикратного втягивания другой пипеткой или в механическом смесителе в течение 5 — 10 с. Частоту вращения смесителя надо подбирать так, чтобы жидкость, которая образует воронку, не доходила до края сосуда на 2 — 3 см.

Примечание — Если известно, что для исследуемых продуктов скопления микроорганизмов более эффективно диспергируются механическим перемешиванием, чем пипеткой, и при этом получаются значительно отличающиеся результаты, то специальный стандарт, касающийся изучаемого продукта, должен рекомендовать только один из этих методов, в основном, с использованием механического перемешивания. Условия использования смесителя должны быть точно указаны.

9.1.2 Другие продукты

Взвешивают навеску испытуемой пробы массой (10±0,01) г или массой, кратной 10 г, в резервуаре вращательного встряхивателя или в пластиковой емкости стомахера вместимостью, достаточной для выполнения исследования и приготовления всех дальнейших разведений, требуемых специальным стандартом для исследуемого продукта.

Добавляют объем разбавителя, равный 9 $см^3$ или кратный 9 $см^3$.

Вращательный встряхиватель используют в течение времени, достаточного для того, чтобы получить от 15000 до 20000 оборотов, но не более 2,5 мин.

Стомахер используют в течение 1 — 2 мин с учетом свойств продукта (см. примечание 2).

Дают осесть крупным частицам в течение 15 мин, затем переносят определенное количество с верхнего слоя суспензии в культуральную пробирку, колбу или флакон, используя большую пипетку. Если имеется слой жира, пробу отбирают из водного слоя. Это количество должно быть достаточным для выполнения всего исследования и приготовления дальнейших разведений. Если для инокуляции или дальнейшего разведения из исходной суспензии необходимо отобрать только одну порцию, то этот перенос можно не делать.

Примечания

1 Для некоторых продуктов (например, для продуктов с острыми частицами или с компонентами, которые трудно измельчить) стомахер не пригоден. Его следует использовать только тогда, когда имеются доказательства (опубликованные данные или сравнительные тесты), что полученные результаты несущественно отличаются от результатов, полученных с использованием вращательного встряхивателя.

2 Следует учитывать тот факт, что для некоторых продуктов, в частности зерновых, данная выше продолжительность встряхивания не подходит для таких микроорганизмов, как дрожжи и плесень.

В этом случае стомахер дает более высокие выходы, чем вращательный встряхиватель. Стомахер следует использовать в течение 10 мин и избегать разделения, так как некоторые дрожжи и плесени могут теряться из надосадочной жидкости.

9.2 Дальнейшие десятикратные разведения

В случае исследования на наличие или отсутствие микроорганизмов в 0,1 $см^3$ или 0,1 г продукта готовят следующие разведения.

Переносят чистой пипеткой (если смесь исходной суспензии была получена пипеткой, используют ту же пипетку) 1 $см^3$ исходной суспензии (первичное 1 + 9 (10^{-1}) разведение в другую пробирку, содержащую 9 $см^3$ стерильного разбавителя, избегая контакта пипетки с разбавителем.

Тщательно перемешивают или путем десятикратного втягивания чистой пипеткой, или в механическом смесителе в течение 5 — 10 с, чтобы получить разведение 10^{-2}. Частоту вращения смесителя подбирают так, чтобы жидкость во время образования воронки не доходила до краев сосуда на 2 — 3 см.

При необходимости повторяют эти операции, используя разведение 10^{-2} или дальнейшие разведения, чтобы получить разведения 10^{-3}, 10^{-4} и т.д. до тех пор, пока не будет получено приемлемое число микроорганизмов.

9.3 Повторение отдельных процедур

Процедуры, описанные в 9.1 и 9.2, проводят такое число раз, которое установлено специальным стандартом для конкретного продукта.

Примечание — Статистически установлено, что для того, чтобы снизить разброс результатов при использовании метода подсчета колоний, следует повторить процедуры с различными порциями испытуемой пробы, а не удваивать число чашек, заселенных из каждой пробирки одной серии разведений.

9.4 Длительность процедуры

Обычно разведения готовят из испытуемой пробы непосредственно перед анализом; длительность процедуры приготовления разведений и использования их для инокуляции культуральной среды должна быть не более 30 мин.

Примечание — Для некоторых продуктов при приготовлении исходной суспензии необходимо соблюдать меры предосторожности, установленные специальным стандартом для конкретного продукта, например:

- использовать для получения суспензии повышенные температуры;
- регулировать pH пробы;
- восстанавливать обезвоженные продукты и оживлять микроорганизмы, поврежденные во время различных обработок и хранения продукта.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ИСО 6497 Корма для животных. Методы отбора проб

ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9209, 9709

Ключевые слова: разведение, разбавитель, стерилизация, исходная суспензия, десятичные разведения, культуральная среда, инокуляция

gost.e-ecolog.ru