

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
52816—  
2007

---

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

**Методы выявления и определения количества  
бактерий группы кишечных палочек  
(колиформных бактерий)**

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2010

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 года № 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 Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности» (ГНУ ВНИИКОП) на основе аутентичных переводов стандартов, указанных в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки фруктов, овощей и грибов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г. № 443-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международным стандартам:

- ИСО 4831:2006 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод для выявления и подсчета количества колиформ. Метод 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», MOD);

- ИСО 4832:2006 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета колиформ. Метод подсчета колоний» (ISO 4832:2006 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique», MOD) в части пищевых продуктов.

При этом дополнительные положения и требования, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены в тексте стандарта курсивом.

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой указанных международных стандартов приведено в дополнительном приложении Б.

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004\* (подраздел 3.5).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок, указанные в приложении В

### 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

### 6 ИЗДАНИЕ (апрель 2010 г.) с Поправкой (ИУС 8—2009)

*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 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*

\* На территории Российской Федерации в части разд. 8 и приложений Ж, И, К действует ГОСТ Р 1.7—2008.

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

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек  
(колиформных бактерий)

Food products. Methods for detection and quantity determination of coliformes

Дата введения — 2009 — 01 — 01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов, и устанавливает метод выявления в определенной навеске пищевого продукта колиформных бактерий и три метода определения их количества: метод наиболее вероятного числа (НВЧ) и методы посева в или на агаризованные селективно-диагностические среды.

Метод определения НВЧ колиформных бактерий предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта менее 150 или в 1 см<sup>3</sup> жидкого продукта менее 15 клеток колиформных бактерий.

Метод определения количества колиформных бактерий посевом в агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 150 или в 1 см<sup>3</sup> жидкого продукта более 15 колониеобразующих единиц (КОЕ) колиформных бактерий.

Метод определения количества колиформных бактерий посевом на агаризованные селективно-диагностические среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 1500 или в 1 см<sup>3</sup> жидкого продукта более 150 КОЕ колиформных бактерий.

Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в масложировой продукции.

(Поправка).

## 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 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

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

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования\*

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

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

\* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

ГОСТ 29184—91 *Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства Enterobacteriaceae*

ГОСТ 30425—97 *Консервы. Метод определения промышленной стерильности*

**П р и м е ч а н и е** — 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 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 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

**3.1 колиформные бактерии:** Бактерии, которые при температуре 37 °С ферментируют лактозу с образованием газа по методам, приведенным в настоящем стандарте.

**3.2 выявление колиформных бактерий:** Определение присутствия или отсутствия колиформных бактерий в определенной массе или объеме продукта в соответствии с настоящим стандартом.

**3.3 определение количества колиформных бактерий:**

**3.3.1** Количество бактерий, содержащееся в 1 см<sup>3</sup> или 1 г продукта, определенное путем посева продукта и (или) его разведений в или на агаризованную селективно-диагностическую среду, подсчете после инкубирования при температуре 37 °С типичных и атипичных колоний и определении возможности бактерий из этих колоний ферментировать лактозу с образованием газа по методам, приведенным в настоящем стандарте.

*При необходимости, подтверждают по биохимическим признакам принадлежность выделенных колоний к колиформным бактериям.*

**3.3.2** Количество бактерий, содержащееся в 1 см<sup>3</sup> или 1 г продукта, определенное по методу НВЧ, указанному в настоящем стандарте.

### 4 Метод выявления колиформных бактерий и определение количества по методу НВЧ

#### Сущность методов

Методы выявления и определения НВЧ колиформных бактерий основаны на высеве определенного количества продукта и (или) разведений навески продукта в жидкую селективную среду с лактозой, инкубировании посевов, учете положительных пробирок, пересеве культуральной жидкости в жидкую селективную среду для учета газообразования *или пересева, при необходимости, культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды для подтверждения по биохимическим и культуральным признакам роста принадлежности выделенных колоний к колиформным бактериям.*

#### 4.1 Метод выявления колиформных бактерий

4.1.1 Пробирку с селективной обогатительной средой инокулируют продуктом или разведением навески продукта и инкубируют при температуре 37 °С 24 или 48 ч.

4.1.2 Пробирку с подтверждающей средой инокулируют из пробирки, полученной по 4.1.1, где отмечено образование газа и/или помутнение и инкубируют при температуре 37 °С 24 или 48 ч.

4.1.3 Присутствие колиформных бактерий считается подтвержденным, в случае если отмечено помутнение и образование газа после осмотра пробирки, полученной по 4.1.2.

#### 4.2 Метод НВЧ — определение количества колиформных бактерий

4.2.1 Три пробирки с жидкой селективной обогатительной средой двойной концентрации инокулируют определенным количеством продукта, если исходный продукт жидкий, или определенным количеством исходной суспензии в случае другого продукта.

4.2.2 Три пробирки с жидкой селективной обогатительной средой нормальной концентрации инокулируют определенным количеством продукта и/или разведением продукта, если исходный продукт жидкий, или определенным количеством исходной суспензии и/или разведением в случае другого продукта.

4.2.3 Посевы в пробирках, содержащие обогатительную среду двойной концентрации, инкубируют при температуре 37 °С 24 ч. Посевы в пробирках со средой нормальной концентрации, инкубируют

24 или 48 ч, после этого в этих пробирках отмечают наличие газа и/или помутнения, мешающего выявлению образования газа.

4.2.4 Пробирки с подтверждающей средой инокулируют культурами из пробирок с обогатительной селективной средой двойной концентрации и культурами из пробирок с обогатительной селективной средой нормальной концентрации, в которых отмечено образование газа и/или помутнение.

Посевы в пробирках с подтверждающей средой инкубируют при температуре 37 °С 24 или 48 ч, после этого в пробирках отмечают образование газа.

4.2.5 Наиболее вероятное число колиформных бактерий в 1 см<sup>3</sup> или 1 г пробы продукта (НВЧ) рассчитывают исходя из числа пробирок с подтверждающей средой (4.2.4), показавших образование газа. Для определения наиболее вероятного числа пользуются таблицей ГОСТ 26670.

## 5 Методы определения количества колиформных бактерий — подсчет колоний

### Сущность методов

Методы определения количества колиформных бактерий посевом в или на агаризованные селективно-диагностические среды основаны на высеве определенного количества продукта и/или его разведений в или на агаризованную селективно-диагностическую среду с лактозой, инкубировании посевов, подсчете типичных и атипичных колоний, пересеве типичных и атипичных колоний в жидкую селективную среду с лактозой для определения газообразования, подтверждения, при необходимости, по биохимическим признакам принадлежности выделенных колоний к колиформным бактериям.

### 5.1 Метод посева в агаризованную селективно-диагностическую среду

5.1.1 Для определения количества колиформных бактерий по 1 см<sup>3</sup> продукта, если продукт жидкий, или по 1 см<sup>3</sup> исходного разведения в случае другого продукта вносят в две стерильные чашки Петри.

Другую пару чашек используют для других количеств — исходной суспензии и/или десятикратных разведений продукта.

Чашки с внесенным в них продуктом или его разведением заливают агаризованной питательной средой.

Посевы в чашках инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

5.1.2 Типичные и атипичные колонии подсчитывают и определяют у бактерий из типичных и атипичных колоний возможность ферментации лактозы.

5.1.3 Число колоний на 1 см<sup>3</sup> или на 1 г продукта рассчитывают по ГОСТ 26670 исходя из числа подтвержденных типичных и атипичных колоний, выросших на чашках.

### 5.2 Метод посева на агаризованную селективно-диагностическую среду

5.2.1 На подсушенную поверхность агаризованной селективно-диагностической среды в двух чашках Петри наносят 0,1—0,2 см<sup>3</sup> продукта, если продукт жидкий, или исходной суспензии в случае другого продукта.

Другую пару чашек используют для других количеств — исходной суспензии или десятикратных разведений продукта.

Внесенный в чашки продукт или его разведения распределяют по поверхности агаризованной питательной среды стерильным шпателем.

Посевы в чашках инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

5.2.2 Типичные и атипичные колонии подсчитывают и определяют у бактерий из этих колоний возможность ферментации лактозы.

5.2.3 Число колоний на 1 см<sup>3</sup> или на 1 г продукта рассчитывают по ГОСТ 26670 исходя из числа подтвержденных типичных и атипичных колоний, выросших на чашках.

## 6 Питательные среды и реактивы

Химические вещества, используемые для приготовления питательных сред и реактивов, должны быть аналитического качества.

### 6.1 Селективная обогатительная среда (лаурил сульфат триптозный бульон)

6.1.1 Состав среды приведен в таблице 1.

Таблица 1

Состав среды	а) Среда двойной концентрации	б) Среда нормальной концентрации
Ферментативный перевар молока и животных протеинов, г	40	20
Лактоза (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O), г	10	5
Двузамещенный фосфорнокислый калий (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), г	5,5	2,75
Однозамещенный фосфорнокислый калий (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), г	5,5	2,75
Натрий хлористый, г	10	5
Натрий лаурил сульфат, г	0,2	0,1
Вода, см <sup>3</sup>	1000	1000

### 6.1.2 Приготовление

При нагревании растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял  $(6,8 \pm 0,2)$  при температуре 25 °С.

Разливают среду по 10 см<sup>3</sup> в пробирки размером приблизительно 16 × 160 мм, содержащие пробирки Дархама (поплавки), в случае использования среды нормальной концентрации, и в пробирки размером приблизительно 20 × 200 мм, не содержащие пробирки Дархама (поплавки), в случае использования среды двойной концентрации.

Стерилизуют среду в автоклаве при температуре  $(121 \pm 1)$  °С в течение 15 мин. Пробирки Дархама (поплавки) после стерилизации не должны содержать пузырьков воздуха.

### 6.2 Бриллиантовый зеленый лактозный желчный бульон

#### 6.2.1 Состав:

ферментативный перевар казеина . . . . .	10 г;
лактоза (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O) . . . . .	10 г;
желчь . . . . .	20 г;
бриллиантовый зеленый . . . . .	0,0133 г
	(или 2,66 см <sup>3</sup> раствора,
	приготовленного по 6.2.3, в случае
	приготовления среды из отдельных компонентов);
вода . . . . .	1000 см <sup>3</sup> .

#### 6.2.2 Приготовление

При нагревании растворяют компоненты или дегидратированную готовую среду в воде. Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял  $(7,2 \pm 0,2)$  при температуре 25 °С. Разливают и стерилизуют среду по 6.1.2.

#### 6.2.3 Раствор бриллиантового зеленого

##### 6.2.3.1 Состав:

бриллиантовый зеленый . . . . .	0,5 г;
вода . . . . .	100 см <sup>3</sup> .

##### 6.2.3.2 Приготовление

Бриллиантовый зеленый переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят водой до метки.

### 6.3 Селективная обогатительная среда (бульон Мак-Конки)

6.3.1 Состав бульона Мак-Конки приведен в таблице 2.

Таблица 2

Состав среды	а) Среда двойной концентрации	б) Среда нормальной концентрации
Пептон, г	40	20
Лактоза (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O), г	20	10
Желчь, г	10	5

Окончание таблицы 2

Состав среды	а) Средя двойной концентрации	б) Средя нормальной концентрации
Раствор бромкрезолового пурпурового, см <sup>3</sup>	2	1
Натрий хлористый, г	10	5
Вода, см <sup>3</sup>	1000	1000

**6.3.2 Приготовление**

При нагревании растворяют компоненты в воде. Нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1—2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят объем до 1 дм<sup>3</sup>, охлаждают до 45 °С—55 °С и устанавливают рН так, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С (7,2 ± 0,1). Разливают и стерилизуют среду по 6.1.2.

**6.3.3 Раствор бромкрезолового пурпурового****6.3.3.1 Состав:**

бромкрезоловый пурпуровый . . . . . 1 г;  
раствор гидроокиси натрия с (NaOH) = 0,1 моль/дм<sup>3</sup> . . . . . 19 см<sup>3</sup>;  
вода . . . . . 80 см<sup>3</sup>.

**6.3.3.2 Приготовление**

Бромкрезоловый пурпуровый переносят в фарфоровую ступку с 19 см<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия с (NaOH) = 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и после растворения добавляют воду.

**6.4 Селективная обогатительная среда (среда Кесслера)**

6.4.1 Состав среды Кесслера приведен в таблице 3.

Таблица 3

Состав среды	а) Средя двойной концентрации	б) Средя нормальной концентрации
Пептон, г	20	10
Лактоза (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O), г	5	2,5
Желчь, г	10	5
Раствор кристаллического фиолетового, см <sup>3</sup>	4	2
Вода, см <sup>3</sup>	1000	1000

**6.4.2 Приготовление**

При нагревании растворяют компоненты в воде. Нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1—2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят объем до 1 дм<sup>3</sup>, охлаждают до 45 °С—55 °С и устанавливают рН так, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С (7,2 ± 0,1).

Разливают среду по 6.1.2 и стерилизуют в автоклаве при температуре (115 ± 1) °С в течение 20 мин.

**6.4.3 Раствор кристаллического фиолетового****6.4.3.1 Состав:**

кристаллический фиолетовый . . . . . 1 г;  
вода . . . . . 100 см<sup>3</sup>.

**6.4.3.2 Приготовление**

Кристаллический фиолетовый переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят водой до метки.

**6.5 Кристалл violet нейтральный красный желчный лактозный агар (VRBL — агар)****6.5.1 Состав:**

ферментативный перевар животных тканей . . . 7 г;  
дрожжевой экстракт . . . . . 3 г;

лактоза ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ ) . . . . .	10 г;
хлористый натрий . . . . .	5 г;
желчные соли . . . . .	1,5 г;
нейтральный красный . . . . .	0,03 г
(или 1 см <sup>3</sup> раствора, приготовленного по 6.5.3, в случае приготовления среды из отдельных компонентов);	
кристаллический фиолетовый . . . . .	0,002 г
(или 0,2 см <sup>3</sup> раствора, приготовленного по 6.4.3, в случае приготовления среды из отдельных компонентов);	
агар . . . . .	12—18 г
(зависит от желирующей способности агара);	
вода . . . . .	1000 см <sup>3</sup> .

### 6.5.2 Приготовление

Основная цель правильного приготовления среды — получение необходимой селективной способности и специфичности среды.

Тщательно размешивают компоненты или дегидратированную готовую среду в воде и оставляют на несколько минут. Устанавливают рН так, чтобы после кипения он составлял  $(7,4 \pm 0,2)$  при температуре 25 °С. Нагревают до кипения, помешивая время от времени. После 2 мин кипения немедленно охлаждают в водяной бане при температуре 44 °С — 47 °С. Избегают перегрева среды, не применяя вторичного нагревания. Среду не стерилизуют в автоклаве. Контролируют стерильность среды во время использования. Используют среду в течение 4 час после приготовления.

### 6.5.3 Раствор нейтрального красного

#### 6.5.3.1 Состав:

нейтральный красный . . . . .	3 г;
вода . . . . .	100 см <sup>3</sup> .

#### 6.5.3.2 Приготовление

Нейтральный красный переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят водой до метки.

### 6.6 Агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным

#### 6.6.1 Состав:

мясной экстракт . . . . .	3 г;
пептон . . . . .	10 г;
лактоза ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ ) . . . . .	10 г;
хлористый натрий . . . . .	5 г;
двузамещенный фосфорнокислый калий ( $K_2HPO_4$ ) . . . . .	0,5 г;
раствор фенолового красного по 6.6.3 . . . . .	40 см <sup>3</sup> ;
раствор бриллиантового зеленого по 6.2.3 . . . . .	2 см <sup>3</sup> ;
агар . . . . .	12—18 г
(зависит от желирующей способности агара);	
вода . . . . .	1000 см <sup>3</sup> .

#### 6.6.2 Приготовление

При нагревании растворяют в воде компоненты. При отсутствии мясного экстракта допускается использовать вместо мясного экстракта, пептона и дистиллированной воды мясопептонный бульон, приготовленный по ГОСТ 10444.1. Смесь нагревают до полного растворения компонентов, доводят объем до 1 дм<sup>3</sup>, охлаждают до 45 °С — 55 °С, устанавливают рН так, чтобы после стерилизации он составлял при температуре 25 °С  $(7,0 \pm 0,1)$ , разливают мерно в колбы или флаконы. Среду стерилизуют при температуре  $(115 \pm 1)$  °С в течение 20 мин, затем охлаждают



до 45 °С — 55 °С. После стерилизации прибавляют раствор фенолового красного и раствор бриллиантового зеленого.

### 6.6.3 Раствор фенолового красного

#### 6.6.3.1 Состав:

феноловый красный . . . . . 0,2 г;  
вода . . . . . 100 см<sup>3</sup>.

#### 6.6.3.2 Приготовление

Феноловый красный переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят водой до метки.

### 6.7 Агар Эндо

Среду готовят по инструкции на этикетке.

### 6.8 Среда Гисса с лактозой

Среду готовят по инструкции на этикетке или по ГОСТ 10444.1.

### 6.9 ГРМ-агар (сухой питательный агар на основе гидролизата рыбной муки для культивирования бактерий)

Среду готовят по инструкции на этикетке.

### 6.10 Мясопептонный агар

Среду готовят по ГОСТ 10444.1.

6.11 При использовании для приготовления питательных сред натуральной говяжьей желчи ей заменяют сухую (1 г сухой желчи равен 10 см<sup>3</sup> натуральной желчи). При этом количество дистиллированной воды, используемой для приготовления сред, уменьшают на количество натуральной желчи (т.е. общий объем среды должен быть равен 1 дм<sup>3</sup>).

6.12 Растворы, приготовленные по 6.2.3, 6.3.3, 6.4.3, 6.5.3 и 6.6.3, хранят в закрытых сосудах из темного стекла при комнатной температуре не более 3 мес.

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

6.14 Допускается использование готовых и дегидратированных питательных сред, в т. ч. хромогенных, отечественного и импортного производства, зарегистрированных в Российской Федерации.

## 7 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы

Привлекомой альтернативой посуде многоразового применения является одноразовая посуда, если она отвечает соответствующим требованиям.

Используют обычное лабораторное оборудование и реактивы для микробиологических исследований по ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ 10444.1 со следующими дополнениями:

- весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200 г (для взвешивания реактивов) с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 мг по ГОСТ 24104;

- весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 1 кг (для взвешивания продукта) с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 20 мг по ГОСТ 24104;

- микроскоп биологический, обеспечивающий просмотр в проходящем свете, с увеличением 900×—1000×;

- прибор для мембранной фильтрации;

- бактериологическая петля платино-иридиевая или никель-хромовая приблизительно 3 мм в диаметре;

- стекла предметные по ГОСТ 9284;

- пробирки размером приблизительно 16 × 160 мм и 20 × 200 мм по ГОСТ 25336;

- пробирки Дархам (поплавки), размером, подходящим для использования в пробирках размером 16 × 160 мм;

- термостат с диапазоном рабочих температур 28 °С — 55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью ± 1 °С;

- бриллиантовый зеленый;

- желчь говяжья сухая или натуральная;
- мясной экстракт;
- нейтральный красный;
- триптический гидролизат желатины;
- триптоза;
- феноловый красный;
- ферментативный перевар животных тканей;
- ферментативный перевар казеина;
- ферментативный перевар молока и животных протеинов;
- дрожжевой экстракт.

## 8 Отбор и подготовка проб

*Отбор и подготовка проб по ГОСТ 26668, ГОСТ 26669.*

*Важно, чтобы для испытания поступила представительная проба, не поврежденная и не измененная в ходе транспортирования или хранения.*

## 9 Проведение испытания

*Схема проведения испытания приведена в приложении А.*

### 9.1 Метод выявления колиформных бактерий

#### 9.1.1 Навеска и исходное разведение

*Отбор навесок и приготовление исходного разведения — по ГОСТ 26669.*

#### 9.1.2 Инокуляция и инкубация

9.1.2.1 В зависимости от требуемых пределов выявления  $x$  см<sup>3</sup> жидкой пробы или  $x$  см<sup>3</sup> исходной суспензии при использовании других продуктов переносят в пробирку, содержащую 10 см<sup>3</sup> обогатительной селективной среды двойной концентрации [см. таблицы 1а, 2а, 3а], когда  $1 \text{ см}^3 < x \leq 10 \text{ см}^3$ , или в пробирку, содержащую 10 см<sup>3</sup> обогатительной селективной среды нормальной концентрации [см. таблицы 1б, 2б, 3б], если  $x \leq 1 \text{ см}^3$ .

*При испытании высококислотных продуктов для предотвращения резкого снижения рН (на 0,5 и более) питательных сред после внесения в них продукта или его разведения рН питательных сред доводят до допустимых значений с помощью стерильного раствора гидроокиси натрия, приготовленного по ГОСТ 10444.1, или при приготовлении питательных сред рН устанавливают выше заданного с учетом его последующего снижения при внесении продукта. Количество добавляемого стерильного раствора гидроокиси натрия или величину, на которую необходимо увеличить рН при приготовлении питательных сред, устанавливают опытным путем.*

*Допускается доводить рН до нейтрального значения с помощью стерильного раствора гидроокиси натрия в самом высококислотном продукте.*

9.1.2.2 Пробирки с посевами в среду двойной концентрации (см. 9.1.2.1) инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч.

9.1.2.3 Пробирки с посевами в среду нормальной концентрации (см. 9.1.2.1) инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч. Если нет образования газа или помутнения, затрудняющего выявление газа, продолжают инкубацию еще  $(24 \pm 2)$  ч.

#### 9.1.3 Подтверждение

9.1.3.1 Из пробирок (см. 9.1.2.2) после инкубации инокулируют петлей подтверждающую среду нормальной концентрации (см. 6.1 — 6.4). Посевы инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч, если нет образования газа, то продолжают наблюдение до  $(48 \pm 2)$  ч.

*В качестве арбитражной среды используют бриллиантовый зеленый лактозный желчный бульон.*

9.1.3.2 Повторяют процедуру, описанную в 9.1.3.1, для пробирок после инкубации по 9.1.2.3, в которых отмечено образование газа или помутнение, препятствующее выявлению образования газа, после  $(24 \pm 2)$  ч или после  $(48 \pm 2)$  ч инкубирования.

#### 9.1.4 Оценка результатов

*Возможные случаи оценки результатов приведены в приложении А.*

Пробирки по 9.1.3.1 или 9.1.3.2, в которых отмечено образование газа после  $(24 \pm 2)$  ч или после  $(48 \pm 2)$  ч, считают положительными.

При выявлении колиформных бактерий отмечают присутствие или отсутствие их в навеске  $x$  г или  $x$  см<sup>3</sup> продукта.

## 9.2 Метод НВЧ — определение количества колиформных бактерий

При определении количества колиформных бактерий по методу НВЧ высевают не менее трех последовательных навесок продукта и (или) его разведений, отличающиеся по количеству продукта в них в 10 раз.

### 9.2.1 Навеска, исходная суспензия и разведения

*Отбор навесок, приготовление исходного разведения и десятикратных разведений проводят по ГОСТ 26669.*

Готовят достаточное число разведений по ГОСТ 26669, гарантируя, что все пробирки, соответствующие конечному разведению, покажут отрицательный результат.

### 9.2.2 Инокуляция и инкубация

9.2.2.1 Используют три пробирки для каждой навески продукта и (или) его разведения.

9.2.2.2 Стерильной пипеткой переносят в каждую из трех пробирок с одной из селективных обогательных сред двойной концентрации [см. таблицы 1а, 2а, 3а ] 10 см<sup>3</sup> пробы, если она жидкая, или 10 см<sup>3</sup> исходной суспензии при использовании других продуктов.

Каждую навеску продукта в трехкратной повторности высевают в среду двойной концентрации в пробирки размером 20 × 200 мм.

*Соотношение между количеством высеваемого продукта и питательной средой двойной концентрации 1:1.*

9.2.2.3 Другой стерильной пипеткой переносят в каждую из трех пробирок с одной из селективных обогательных сред нормальной концентрации [см. таблицы 1б, 2б, 3б] 1 см<sup>3</sup> пробы, если продукт жидкий, или 1 см<sup>3</sup> исходной суспензии при использовании других продуктов.

Каждую навеску продукта и (или) его разведения в трехкратной повторности высевают в пробирки размером 16 × 160 мм.

*Соотношение между количеством высеваемого продукта или его разведением и питательной средой 1:10.*

9.2.2.4 Каждое последующее разведение высевают в соответствии с 9.2.2.3, используя новую стерильную пипетку. Осторожно перемешивают инокулум и среду.

9.2.2.5 Пробирки с посевами в среду двойной концентрации (см. 9.2.2.2) инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч.

9.2.2.6 Пробирки с посевами в среду нормальной концентрации (см. 9.2.2.3 и 9.2.2.4) инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч. Если нет образования газа и/или помутнения, препятствующего выявлению образования газа, продолжают инкубирование еще  $(24 \pm 2)$  ч.

### 9.2.3 Подтверждение

9.2.3.1 Из каждой пробирки после инкубации по 9.2.2.5 инокулируют петлей подтверждающую среду (6.1б—6.4б). Посевы инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч. Если нет образования газа и/или помутнения, то продолжают инкубирование еще  $(24 \pm 2)$  ч.

В качестве арбитражной среды используют бриллиантовый зеленый лактозный бульон.

9.2.3.2 Повторяют процедуру, описанную в 9.2.3.1 для пробирок после инкубации по 9.2.2.6, показавших образование газа и/или помутнение после  $(24 \pm 2)$  ч или после  $(48 \pm 2)$  ч.

*Допускается не проводить пересев на жидкую подтверждающую среду при явном газообразовании на жидких средах нормальной концентрации, считая при этом эти посевы положительными.*

### 9.2.4 Оценка результатов

*Возможные случаи оценки результатов приведены в приложении А.*

Для каждой навески продукта и/или его разведения подсчитывают число пробирок, в которых обнаружено образование газа (положительные пробирки) после  $(24 \pm 2)$  ч и (если использовали) после  $(48 \pm 2)$  ч.

### 9.2.5 Подсчет и выражение результатов

Подсчитывают наиболее вероятное число, исходя из числа положительных пробирок в каждой навеске продукта и/или его разведении. По ГОСТ 26670 определяют НВЧ колиформных бактерий в 1 г или 1 см<sup>3</sup> продукта.

## 9.3 Метод определения количества колиформных бактерий — подсчет колоний

### 9.3.1 Навеска и исходное разведение

*Отбор навесок и приготовление исходного разведения — по ГОСТ 26669.*

### 9.3.2 Инокуляция и инкубация

9.3.2.1 Для посева жидкого продукта и/или каждого разведения используют две параллельные чашки Петри. Переносят стерильной пипеткой  $1 \text{ см}^3$  жидкого продукта или соответствующего разведения в центр каждой чашки. При посеве жидкого продукта и/или каждого разведения в чашку Петри используют отдельную стерильную пипетку.

9.3.2.2 В каждую чашку Петри (9.3.2.1) наливают около  $15 \text{ см}^3$  одной из сред (6.5—6.7) температурой  $44^\circ\text{C}$ — $47^\circ\text{C}$ . Время, прошедшее между посевом продукта и/или его разведения в чашку Петри и заливкой среды, не должно превышать 15 мин.

Аккуратно перемешивают инокулят со средой и оставляют смесь для застывания, для этого чашки Петри помещают на холодную горизонтальную поверхность.

*В качестве арбитражной среды используют VRBL — агар.*

Параллельно для контроля стерильности агаризованной среды в стерильную чашку Петри наливают приблизительно  $15 \text{ см}^3$  среды и инкубируют вместе с посевами.

9.3.2.3 После застывания среды в чашках Петри на ее поверхность наливают около  $4 \text{ см}^3$  использованной агаризованной среды (6.5—6.7) температурой  $44^\circ\text{C}$ — $47^\circ\text{C}$  для создания второго слоя. Добавленная среда должна затвердеть, как описано в 9.3.2.2.

9.3.2.4 При определении колиформных бактерий посевом на агаризованные селективно-диагностические среды (6.5—6.7) по  $0,1$  или  $0,2 \text{ см}^3$  навески продукта или его разведения наносят на поверхность одной из этих сред, разлитых в две параллельные чашки Петри. Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посев проводят по ГОСТ 26670.

*При применении метода мембранных фильтров по ГОСТ 26670 фильтры переносят на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды, избегая образования пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх.*

*При посеве методом мембранных фильтров на них подсчитывают количество колоний и в том случае, если их менее 15.*

9.3.2.5 Переворачивают крышкой вниз приготовленные чашки по 9.3.2.3 и 9.3.2.4 и инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч.

#### 9.3.3 Подсчет количества колоний

После инкубации по 9.3.2.5 отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Посевы просматривают и отмечают рост типичных и атипичных колоний.

На VRBL-агаре типичные колонии колиформных бактерий пурпурно-красные диаметром не менее  $0,5 \text{ мм}$ , иногда окружены красноватой зоной преципитата (осадка) желчи.

*На агаре с бриллиантовым зеленым и феноловым красным типичные колонии колиформных бактерий зеленоватые, окруженные яркой желто-зеленой зоной.*

*На среде Эндо типичные колонии колиформных бактерий от розового до красного цвета, часто с металлическим блеском.*

Атипичные колонии отличаются от типичных по цвету и размеру. К атипичным относят также все типичные колонии, выросшие в результате ферментации сахаров, за исключением лактозы, содержащихся в пищевых продуктах. Такие колонии не будут принадлежать к колиформным бактериям.

Подсчитывают на агаризованных средах отдельно количество типичных и атипичных колоний.

#### 9.3.4 Подтверждение принадлежности бактерий из колоний к колиформным бактериям

Отбирают не менее чем по пять атипичных и типичных колоний. Каждую отобранную колонию пересевают в пробирки с одной из жидких питательных сред, приготовленной по 6.1—6.4.

В качестве арбитражной среды используют лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью.

Рост с газообразованием при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч указывает на принадлежность бактерий из атипичных и типичных колоний к колиформным.

#### 9.3.5 Подсчет и выражение результатов

Если при подтверждении типичных или атипичных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост колиформных бактерий, то считают, что все колонии, выросшие на чашке Петри (см. 9.3.3), принадлежат к колиформным бактериям. В остальных случаях количество

колиформных бактерий определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

Пересчет количества колиформных бактерий, определенного посевом в или на агаризованные среды, на 1 г (см<sup>3</sup>) продукта проводят по ГОСТ 26670.

Результаты определения количества колиформных бактерий и выявления их в определенной навеске продукта записывают по ГОСТ 26670.

*9.3.6 Допускается также выявление колиформных бактерий проводить посевом в или на агаризованную среду при условии, что навеску продукта, в которой предусматривается выявление, возможно посеять по этому методу.*

*При выявлении колиформных бактерий посевом в или на агаризованную среду подсчета количества колоний не проводят.*

## **10 Дополнительное подтверждение принадлежности выявленных бактерий к колиформным бактериям**

*10.1 При необходимости, для дополнительного подтверждения принадлежности бактерий, выросших на жидких средах (там, где отмечено газообразование), к колиформным бактериям делают пересевы по ГОСТ 26670 на поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред (6.5 — 6.7). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. После термостатирования отмечают рост типичных и атипичных колоний.*

*10.2 Для дополнительного подтверждения принадлежности выросших бактерий к колиформным бактериям отбирают не менее чем по пять типичных и атипичных колоний из чашек Петри с посевами по 9.3.3.*

*Атипичные колонии отбирают те, в которых подтверждено наличие колиформных бактерий посевом в жидкую подтверждающую среду.*

*10.3 Каждую отобранную для подтверждения колонию пересевают на поверхность скошенного питательного агара по 6.9 или 6.10, посевы термостатируют при температуре (31 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.*

*Принадлежность к колиформным бактериям определяют по отношению к окраске по Граму, по отсутствию оксидазы, по ферментации лактозы на среде Гисса.*

### **10.3.1 Окраска по Граму**

*Приготовление мазков из культур, выросших на скошенной поверхности питательного агара, и окраску их по Граму, проводят по ГОСТ 30425. Колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.*

*Допускается окраску по Граму заменять тестом Грегорсена, для этого на предметном стекле в капле 3 %-ного водного раствора калия гидроксида эмульгируют петлей культуру микроорганизмов, взятую из колонии с плотной среды. Если через несколько секунд за петлей тянутся слизистые нити, то это указывает на принадлежность испытуемой культуры к грамотрицательному виду. У грамположительных бактерий слизистых нитей не образуется.*

### **10.3.2 Определение отсутствия оксидазы**

*Определение отсутствия оксидазы проводят по ГОСТ 29184.*

*Для определения оксидазы допускается использование дисков и растворов отечественного и импортного (зарегистрированных в Российской Федерации) промышленного производства. Для контроля качества дисков и растворов используют музейные оксидазоположительные и оксидазоотрицательные культуры.*

### **10.3.3 Определение ферментации лактозы**

*Для определения ферментации лактозы испытуемую культуру высевают уколом в среду Гисса с лактозой.*

*Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.*

*Колиформные бактерии ферментируют лактозу с образованием кислоты (цвет среды меняется) и газа.*

*10.4 По результатам дополнительного подтверждения к колиформным бактериям относят аэробные и факультативно-анаэробные не образующие спор грамотрицательные оксидазоотрицательные палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа.*

### **11 Протокол испытания**

*Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.*

Протокол испытания должен включать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации продукта;
- используемый метод в соответствии с настоящим стандартом;
- все детали испытания, не установленные настоящим стандартом;
- полученный(е) результат(ы).

Приложение А  
(справочное)

Схема выявления колиформных бактерий

А.1 Схема выявления колиформных бактерий приведена на рисунке А.1.

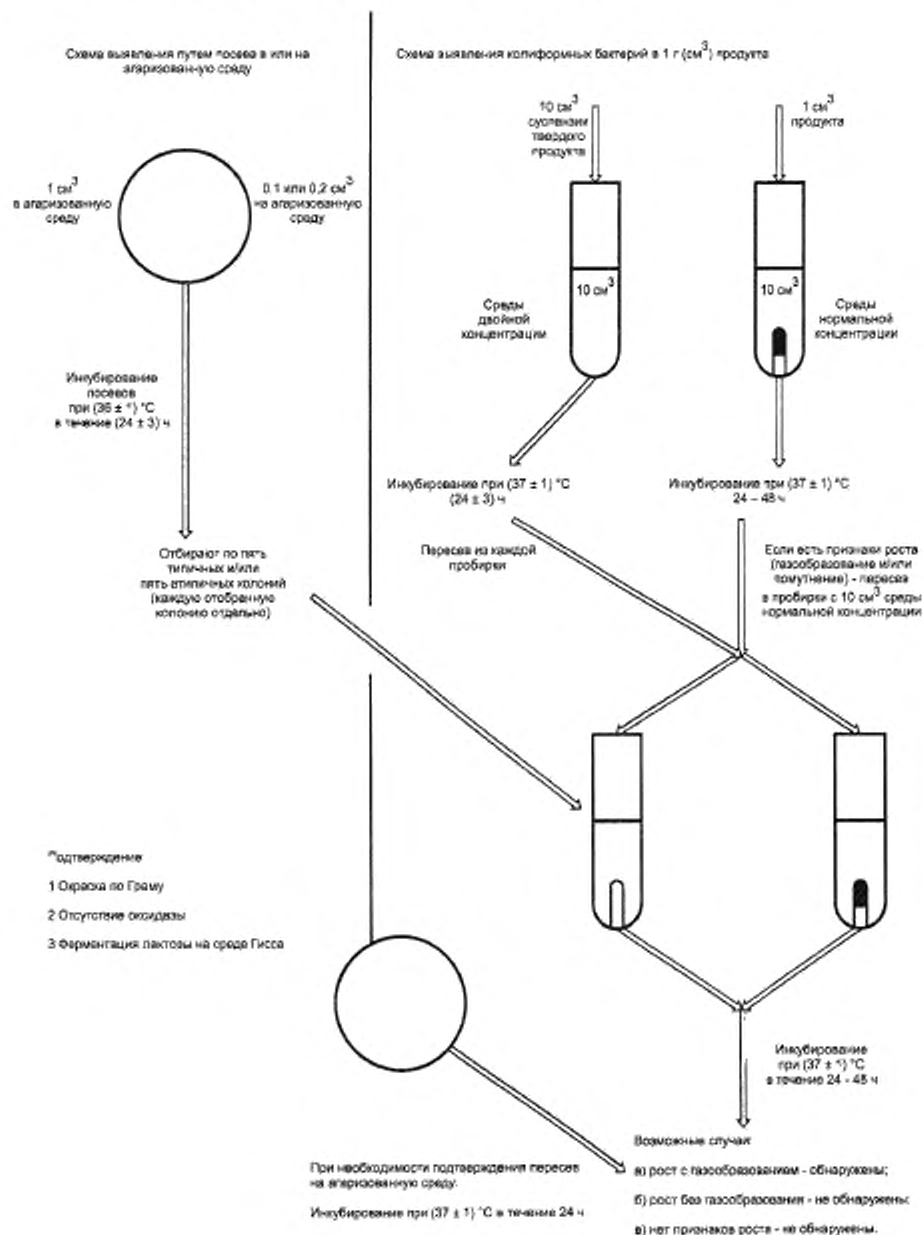


Рисунок А.1

**Приложение Б**  
**(справочное)**

**Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененных  
в нем международных стандартов**

Б.1 Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой ИСО 4831:2006 приведено в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Структура международного стандарта ИСО 4831:2006			Структура настоящего стандарта		
Раздел	Пункты	Подпункты	Раздел	Пункты	Подпункты
1 Область распространения	—	—	1 Область применения	—	—
2 Нормативные ссылки	—	—	2 Нормативные ссылки	—	—
3 Термины и определения	3.1—3.3	—	3 Термины и определения	3.1—3.3	3.3.1, 3.3.2
4 Сущность метода	4.1, 4.2	4.1.1—4.1.3, 4.2.1—4.2.6	4 Методы выявления колиформных бактерий и определение количества по методу НВЧ	4.1, 4.2	4.1.1—4.1.3, 4.2.1—4.2.5
5 Питательные среды и разведения	5.1—5.4	—	6 Питательные среды и реактивы	6.1—6.14	—
6 Аппаратура и посуда	6.1—6.7	—	7 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы	—	—
7 Отбор проб	—	—	8 Отбор и подготовка проб	—	—
8 Приготовление проб	—	—			
9 Испытание	9.1, 9.2	9.1.1—9.1.4, 9.2.1—9.2.4	9 Проведение испытания	9.1, 9.2	9.1.1—9.1.4, 9.2.1—9.2.5
10 Подсчет и выражение результатов	—	—	10 Дополнительное подтверждение принадлежности выявленных бактерий к колиформным бактериям	10.1—10.4	—
11 Точность	—	—	—	—	—
12 Протокол испытания	—	—	11 Протокол испытания	—	—
Приложение А	—	—	Приложение А	—	—



Б.2 Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой ИСО 4832:2006 приведено в таблице Б.2.

Таблица Б.2

Структура международного стандарта ИСО 4832:2006			Структура настоящего стандарта		
Раздел	Пункты	Подпункты	Раздел	Пункты	Подпункты
1 Область распространения	—	—	1 Область применения	—	—
2 Нормативные ссылки	—	—	2 Нормативные ссылки	—	—
3 Термины и определения	3.1	—	3 Термины и определения	3.1—3.3	—
4 Сущность метода посева в агаризованную среду	4.1—4.4	—	5 Методы определения количества колиформных бактерий — подсчет колоний	5.1, 5.2	5.1.1—5.1.3, 5.2.1—5.2.3
5 Питательные среды и разведения	5.1—5.4	—	6 Питательные среды и реактивы	6.1—6.14	—
6 Аппаратура и посуда	6.1—6.11	—	7 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы	—	—
7 Отбор проб	—	—	8 Отбор и подготовка проб	—	—
8 Подготовка проб	—	—			
9 Испытание с подтверждением принадлежности только атипичных колоний к колиформным бактериям	9.1—9.4	9.2.1—9.2.4	9 Проведение испытания	9.3	9.3.1—9.3.6
10 Выражение результатов	—	—	10 Дополнительное подтверждение принадлежности выявленных бактерий к колиформным бактериям	10.1—10.4	—
11 Точность	—	—	—	—	—
12 Протокол испытания	—	—	11 Протокол испытания	—	—
—	—	—	Приложение А	—	—

**Приложение В**  
**(справочное)**

**Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов  
национальным стандартам Российской Федерации, использованным  
в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок**

Таблица В.1

Обозначение ссылочного международного и национального стандарта Российской Федерации	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта и условное обозначение степени его соответствия ссылочному национальному стандарту
ГОСТ Р 51446—99* (ИСО 7218—96)	ИСО 7218:1996 «Микробиология продуктов питания и кормовых продуктов. Общие правила микробиологических исследований» (MOD)
ГОСТ 9284—75	—
ГОСТ 10444.1—84	—
ГОСТ 24104—2001	—
ГОСТ 25336—82	—
ГОСТ 26668—85	—
ГОСТ 26669—85	—
ГОСТ 26670—91	—
ГОСТ 29184—91	—
ГОСТ 30425—97	—
<p>* С 1 января 2010 г. введен в действие ГОСТ Р ИСО 7218—2008.</p> <p>П р и м е ч а н и е — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов: - MOD — модифицированный стандарт.</p>	

УДК 663/664:543.9:006.354

ОКС 07.100.30

Н09

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: колиформные бактерии, колониеобразующие единицы (КОЕ), типичные и атипичные колонии, питательные среды, инкубирование посевов, оксидаза, окраска по Граму, наиболее вероятное число (НВЧ)

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

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 1. После четвертого абзаца	—	Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в масложировой продукции.

(ИУС № 8 2009 г.)

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

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 1. После четвертого абзаца	—	Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в масложировой продукции.

(ИУС № 8 2009 г.)