
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
53400—
2009
(ИСО 7937:2004)

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод подсчета колоний *Clostridium perfringens*

ISO 7937:2004
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the
enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique
(MOD)

Издание официальное

БЗ 8—2009/382



Москва
Стандартинформ
2010

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») и Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Российской академии медицинских наук (ГУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН) на основе аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 сентября 2009 г. № 423-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 7937:2004 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета *Clostridium perfringens*. Метод подсчета колоний» (ISO 7937:2004 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique»). При этом в него не включены предисловие, отдельные слова и фразы примененного международного стандарта, которые нецелесообразно применять в национальной стандартизации. Дополнительные слова, фразы, абзацы, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены курсивом.

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

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

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартиформ. 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Разведение, питательные среды и реактивы	2
6 Оборудование и лабораторная посуда	6
7 Отбор проб	6
8 Подготовка проб для испытания	6
9 Проведение определения	7
10 Обработка результатов	8
11 Протокол испытания	10
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторного испытания	11
Приложение В (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок	14
Библиография	15

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Метод подсчета колоний *Clostridium perfringens*

Method microbiology of food and animal feeding stuffs. Method of *Clostridium perfringens* colonies count

Дата введения — 2011—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов *Clostridium perfringens*.

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

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 правила микробиологических исследований

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

ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

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

ГОСТ Р 51448—99 (ИСО 3100-2—88) Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по 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 применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **Clostridium perfringens** (*C. perfringens*): Бактерии, которые образуют типичные колонии (черный осадок, вызванный разложением сульфита до сульфида, который окрашивает колонии в черный цвет) в определенных селективных средах, и которые дают положительные реакции подтверждения, если испытания проводят в соответствии с одним из двух методов, указанных в настоящем стандарте.

3.2 **подсчет колоний C. perfringens**: Определение количества способных к росту и подтвержденных бактерий *Clostridium perfringens* в см³ или г образца при условии проведения испытания в соответствии с методом, указанным в настоящем стандарте.

4 Сущность метода

4.1 Посев в чашки Петри определенного количества испытуемой пробы, если исходный продукт жидкий, или установленного количества исходной суспензии.

Следующий посев в чашки Петри проводят в аналогичных условиях с использованием десятикратного разведения испытуемой пробы или исходной суспензии.

Добавляют селективную среду (метод пластинчатого посева) и заливают посев сверху слоем той же среды.

4.2 Анаэробная инкубация чашек при 37 °С в течение (20 ± 2) ч.

4.3 Подсчет типичных колоний.

4.4 Подтверждение ряда типичных колоний и определение количества колоний *C. perfringens* в г или см³ продукта.

5 Разведение, питательные среды и реактивы

В лабораторной практике используют ГОСТ Р ИСО 7218, ГОСТ Р 51448, ГОСТ Р ИСО 11133-1 и ГОСТ Р ИСО 11133-2 для приготовления, производства, проверки и применения питательных сред.

5.1 Разведения

В общем случае разведения по ГОСТ Р ИСО 7218.

5.2 Сульфит-циclosеринный агар (SC)

5.2.1 Состав в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Состав	Значение показателя
Ферментативный белковый гидролизат, г	15,0
Ферментативный соевый гидролизат, г	5,0
Дрожжевой экстракт, г	5,0
Двуназрий дисульфит безводный (Na ₂ S ₂ O ₃), г	1,0
Железо (III) — аммония цитрат*, г	1,0
Агар, г	От 9,0 до 18,0**
Вода, см ³	1000
* Реактив должен содержать не менее 15 % железа (массовая доля).	
** В зависимости от гелеобразующей способности агара.	

5.2.1.1 Приготовление среды

Растворяют компоненты среды в горячей воде и доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,6 ± 0,2) при 25 °С.

Разливают среду во флаконы или бутылки соответствующей емкости.

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

Хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более двух недель после приготовления.

5.2.2 Раствор D-циклосерина

5.2.2.1 Состав в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Состав	Значение показателя
D-циклосерин*, г	4,0
Вода, см ³	100

* Используется белый кристаллический порошок.

5.2.2.2 Приготовление среды

Растворяют D-циклосерин в воде и стерилизуют.

Среду хранят в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С не более четырех недель после приготовления.

5.2.3 Полная среда

Непосредственно перед посевом чашечным методом (см. 9.2) добавляют 1 см³ раствора D-циклосерина (см. 5.2.2) к каждой порции стерильной расплавленной основы среды объемом 100 см³ (см. 5.3.1), охлажденной до 44 °С—47 °С.

5.2.4 Проверка качества среды (SC)

Определение селективности и качества среды проводят по ГОСТ Р ИСО 11133-1. Для проверки характеристик применяют ГОСТ Р ИСО 11133-2 (таблица В.1).

5.3 Жидкая тиогликолатная среда

5.3.1 Состав в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3

Состав	Значение показателя
Ферментативный перевар казеина, г	10,0
L-Цистин, г	0,5
D-Глюкоза, г	5,5
Дрожжевой экстракт, г	5,0
Хлорид натрия, г	2,5
Натрия тиогликолат (меркаптоацетат), г	0,5
Агар, г	0,5—2,0*
Диазрезорин, г	0,001
Вода, см ³	1000

* В зависимости от гелеобразующей способности агара.

5.3.2 Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал $(7,3 \pm 0,2)$ при 25 °С.

Среду разливают по 10 см³ в пробирки 16 × 160 мм и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С.

Перед использованием среда должна быть деаэрирована.

5.3.3 Проверка качества тиогликолатной среды

Определение селективности и качества среды проводят по ГОСТ Р ИСО 11133-1. Для проверки характеристик применяют ГОСТ Р ИСО 11133-2 (см. таблицу В.4).

5.4 Лакто-сульфитная среда (LS) (необязательно)**5.4.1 Основа среды**

5.4.1.1 Состав в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Состав	Значение показателя
Ферментативный перевар казеина, г	5,0
Дрожжевой экстракт, г	2,5
Хлорид натрия, г	2,5
Лактоза, г	10,0
L-Цистин гидрохлорид, г	0,3
D-Глюкоза, г	5,5
Вода, см ³	1000

5.4.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал $(7,1 \pm 0,2)$ при 25 °С.

Среду разливают по 8 см³ в пробирки с обратными трубками Дархема и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С.

Среду хранят в холодильнике при температуре (3 ± 2) °С не более четырех недель после приготовления.

5.4.2 Раствор безводного метабисульфита натрия

5.4.2.1 Состав в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

Состав	Значение показателя
Двунарий дисульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) безводный, г	1,2
Вода, см ³	100

5.4.2.2 Приготовление

Растворяют двунарий дисульфит в воде и стерилизуют.

Раствор используют в течение дня.

5.4.3 Раствор цитрата железа (III) — аммония

5.4.3.1 Состав в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

Состав	Значение показателя
Железа (III) — аммония цитрат, г	1,0
Вода, см ³	100

5.4.3.2 Приготовление раствора

Растворяют цитрат железа (III) — аммония в воде и стерилизуют раствором фильтрованием.

Раствор используют в течение дня.

5.4.4 Полная среда

Перед составлением полной среды ее деаэрируют нагреванием и последующим быстрым охлаждением. В случае хранения среды во флаконах с завинчивающимися крышками крышки ослабляют перед нагреванием и затем завинчивают перед охлаждением.

Затем к каждому 8 см³ основы среды (см. 5.4.1) добавляют 0,5 см³ раствора цитрата железа (III) — аммония (см. 5.4.3) и 0,5 см³ раствора двуназрия дисульфита (см. 5.4.2)

Среда используется в течение дня.

5.5 Подвижная нитратная среда (необязательно)

5.5.1 Состав в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

Состав	Значение показателя
Ферментативный гидролизат казеина, г	5,0
Мясной экстракт, г	3,0
Галактоза, г	5,0
Глицерин, г	5,0
Азотнокислый калий (KNO ₃), г	1,0
Динатрийфосфат (Na ₂ HPO ₄), г	2,5
Агар, г	1,0—5,0*
Диазорезорин, г	0,001
Вода, см ³	1000

* В зависимости от теплообразующей способности агара.

5.5.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, при необходимости раствор доводят до кипения. Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал (7,3 ± 0,2) при 25 °С.

Среду разливают в пробирки с выросшей разводкой-культурой по 10 см³ и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С. Если среду не использовали в день приготовления, то ее хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более четырех недель после приготовления.

Непосредственно перед использованием подогревают в кипящей воде или на пару в течение 15 мин и затем быстро охлаждают до температуры разведения.

5.6 Нитратный реактив обнаружения (необязательно)**5.6.1 Раствор 5-амино-2-нафталинсульфо кислоты (5-2-ANSA)**

Растворяют 0,1 г 5-2-ANSA в 100 см³ 15 %-ного (объемная доля) раствора уксусной кислоты. Фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив хранят в хорошо закупоренном флаконе (предпочтительно с капельницей шаровидной формы) в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

5.6.2 Раствор сульфаниловой кислоты

Растворяют 0,4 г сульфаниловой кислоты в 100 см³ 15 %-ного (объемная доля) раствора уксусной кислоты. Фильтруют через бумажный фильтр.

Реактив хранят в хорошо закупоренном флаконе (предпочтительно с капельницей шаровидной формы) в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С.

5.6.3 Приготовление полного реактива

Смешивают равные количества двух растворов (см. 5.6.1 и 5.6.2) непосредственно перед использованием. Неиспользованный реактив уничтожают.

5.7 Цинковая пыль (необязательно)**5.8 Лактозо-желатиновая среда**

5.8.1 Состав в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8

Состав	Значение показателя
Ферментативный гидролизат казеина, г	15,0
Дрожжевой экстракт, г	10,0
Галактоза, г	10,0
Желатин, г	120,0
Фенол красный, г	0,05
Вода, см ³	1000

5.8.2 Приготовление среды

Растворяют компоненты в воде (кроме лактозы и фенола красного). Устанавливают уровень pH, чтобы после стерилизации он соответствовал $(7,5 \pm 0,2)$ при 25 °С.

Добавляют лактозу и фенол красный. Среду разливают в пробирки по 10 см³ и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 121 °С. Если среду не использовали в день приготовления, то ее хранят в холодильнике при температуре (5 ± 3) °С не более трех недель после приготовления.

Непосредственно перед использованием подогревают в кипящей воде или на пару в течение 15 мин и затем быстро охлаждают до температуры разведения.

6 Оборудование и лабораторная посуда

Примечание — При одинаковой спецификации одноразовое оборудование предпочтительнее много-разового.

Используют обычное лабораторное оборудование, а также следующее:

- 6.1 Стерилизаторы сухожаровые (печи) или паровые (автоклавы) по ГОСТ Р ИСО 7218.
- 6.2 Термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С.
- 6.3 Анаэростат, обеспечивающий культивирование анаэробных микроорганизмов.
- 6.4 pH-метр с разрешением 0,01 единиц pH и точностью $\pm 0,1$ pH при 25 °С.
- 6.5 Бактериологические петли из платино-иридиевого или никель-хромового сплава, около 3 мм в диаметре, и иглы из тех же материалов для пересева в агаровые косяки.
- 6.6 Приборы для фильтрования, предназначенные для стерилизации растворов.
- 6.7 Пробирки размером 16 × 160 мм с перевернутыми трубками Дархема, длиной 35 мм и диаметром 7 мм.
- 6.8 Пипетки с полным сливом, номинальным объемом от 1 до 10 см³.
- 6.9 Чашки Петри, из стекла или пластмассы, диаметром 90—100 мм.
- 6.10 Водяная баня, поддерживающая температуру от 44 °С до 47 °С.
- 6.11 Резиновые колбы, используемые с градуированными пипетками для разбрызгивания компонентов нитратного реактива обнаружения (при необходимости).

7 Отбор проб

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

Отбор проб не является частью метода, приведенного в настоящем стандарте. Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон касательно отбора проб конкретного продукта при отсутствии специального стандарта для данного продукта.

8 Подготовка проб для испытания

Подготовку проб проводят в соответствии со специальным стандартом для данного продукта. Рекомендуется достижение соглашения заинтересованных сторон касательно подготовки проб конкретного продукта при отсутствии специального стандарта на подготовку проб данного продукта.

9 Проведение определения

9.1 Метод приготовления исходной суспензии и последующие разведения

Приготовление пробы и первичного разведения в зависимости от вида продукта согласно соответствующей части ГОСТ 26669.

9.2 Посев и инкубирование (чашечный метод)

С помощью стерильной пипетки (см. 6.8) переносят в двух повторностях 1 см³ исходной суспензии или испытуемой пробы (если продукт жидкий) в центр пустых чашек Петри (см. 6.9).

Наливают в обе чашки от 10 до 15 см³ SC агара (см. 5.2.3), подогретого в водяной бане (см. 6.10) при температуре от 44 °С до 47 °С, и хорошо перемешивают с испытуемой пробой, осторожно вращая чашки. После затвердевания среды добавляют сверху 10 см³ дополнительно SC агара.

Оставляют чашки для затвердевания агара. Застывшие чашки агара с исходной пробой помещают в анаэробстат или другие приборы, обеспечивающие культивирование анаэробных микроорганизмов, и инкубируют в анаэробных условиях в течение (20 ± 2) ч при температуре 37 °С.

Более продолжительное инкубирование может привести к излишнему почернению среды.

Повторяют процедуру с последующими десятикратными разведениями (см. 9.1).

9.3 Подсчет и выделение колоний

После установленного периода инкубации (см. 9.2) выделяют все чашки Петри, содержащие менее 150 колоний. Из них выделяют чашки с двумя последовательными разведениями. Подсчитывают на каждой чашке характерные колонии, предположительно относящиеся к *S. perfringens*.

Выделяют из каждой чашки пять типичных колоний и подтверждают их, используя одну из методик, описанных в 9.4.2 или 9.4.3.

9.4 Биохимическое подтверждение

9.4.1 Общие положения

Для целей подтверждения может быть использован набор сред для биохимических испытаний в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7218.

9.4.2 Методика подтверждения с использованием среды LS

Примечание — Реакция, протекающая в лактозо-сульфитной среде (см. 5.4) при 46 °С, очень специфична для *S. perfringens* и *S. absolum*. Поэтому необязательно добиваться дополнительной очистки черных колоний, выделенных с агаровой среды, перед их посевом на тиогликолатную и затем на лактозо-сульфитную среду.

9.4.2.1 Пересев и инкубирование

Каждую изолированную колонию (см. 9.3) пересевают на жидкую тиогликолатную среду (см. 5.3). Инкубируют в анаэробных условиях в течение 18—24 ч при температуре 37 °С.

9.4.2.2 Обработка результатов

Исследуют пробирку с LS средой, учитывая образование газа и наличие черного окрашивания (осадок сульфата железа). Трубки Дархема, заполненные более чем на одну четвертую часть газом, и пробирки, содержащие черный осадок, оценивают как положительные.

В сомнительных случаях, когда трубка Дархема в пробирке с почерневшей средой заполнена газом менее чем на четверть, без промедления, с помощью стерильной пипетки переносят пять капель культуры с LS средой (см. 9.4.2.1) в другую пробирку с той же средой. Инкубируют на водяной бане (см. 6.10) при температуре от 46 °С в течение 18—24 ч. Оценивают эти пробирки, как описано выше.

Бактерии, которые образуют типичные колонии на LS среде и дают положительную реакцию подтверждения на LS среде, относят к *S. perfringens*. Во всех прочих случаях пробирки с посевами рассматривают как отрицательные.

9.4.3 Методика подтверждения с использованием подвижной нитратной среды и лактозо-желатиновой среды

9.4.3.1 Общие положения

Для данной методики подтверждения требуются хорошо изолированные типичные колонии. Если их нет (т. е. они чрезмерно разрослись на поверхности чашек, и нет возможности выбрать хорошо изолированные типичные колонии), засевают пять типичных колоний на предварительно деаэрированные жидкие тиогликолатные среды (см. 5.3).

Инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18—24 ч. Штрихуют колонии на чашках с основным агаром SC (5.2.1.2) и добавляют сверху 10 см³ основного агара SC.

Дают застыть агару и инкубируют в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18—24 ч. Потом выбирают из каждой чашки одну типичную и хорошо выделенную колонию.

При необходимости повторяют штрихование и посев на чашки Петри с основным агаром SC до получения хорошо изолированных типичных колоний.

Подтверждают каждую колонию, как описано в 9.4.3.2, 9.4.3.3 и 9.4.3.4.

9.4.3.2 Инокуляция и исследование подвижной нитратной среды

Инокулируют уколом каждую выделенную колонию (см. 9.3) в только что деаэрированную подвижную нитратную среду (см. 5.5).

Инкубируют в анаэробных условиях при 3 °С в течение 24 ч. Исследуют пробирку с подвижной нитратной средой на тип культуры по линии укола. Подвижность очевидна по диффузному распределению бактерий в среду от линии укола.

Проводят испытание на присутствие нитрита, добавляя с помощью градуированной пипетки (см. 6.8) и резиновой колбы (см. 6.11) от 0,2 до 0,5 см³ нитритного реактива обнаружения (см. 5.6) в каждую пробирку с подвижной нитратной средой.

Примечание — В целях безопасности проводят это испытание в вытяжном шкафу.

Образование красного цвета подтверждает восстановление нитрата до нитрита. Если красный цвет не появляется в течение 15 мин, добавляют небольшое количество цинковой пыли (см. 5.7) и дают отстояться в течение 10 мин. Если красный цвет не появился после добавления цинковой пыли, восстановления нитрата не произошло.

9.4.3.3 Инокуляция и исследование лактозо-желатиновой среды

Инокулируют каждую выделенную колонию (см. 9.3) в только что деаэрированную лактозо-желатиновую среду (см. 5.8). Инкубируют в анаэробных условиях при 37 °С в течение 24 ч.

Исследуют пробирку с лактозо-желатиновой средой на присутствие газа и желтого цвета (благодаря образованию кислоты), указывающих на ферментацию лактозы. Охлаждают пробирки при 5 °С в течение 1 ч и проверяют на сжижение желатина. Если среда застыла, повторно инкубируют в течение еще 24 ч и снова проверяют на сжижение желатина.

9.4.3.4 Интерпретация

Бактерии, которые образуют черные колонии в среде SC, неподвижны, обычно восстанавливают нитрат до нитрита, вырабатывают кислоту и газ из лактозы и сжижают желатин за 48 ч, относятся к бактериям *S. perfringens*. Культуры, которые дают слабую реакцию на нитрит (т. е. розового цвета), должны быть ликвидированы, так как бактерии *S. perfringens* дают сильную и немедленную реакцию.

10 Обработка результатов

10.1 Метод расчета

Обработка результатов — по ГОСТ Р ИСО 7218.

10.2 Сходимость

10.2.1 Межлабораторные испытания

Данные о сходимости этого метода, описанные в настоящем стандарте, базируются на результатах межлабораторного испытания [1]. Детали этого межлабораторного испытания приведены в приложении А. Предельные значения повторяемости и воспроизводимости определялись на трех видах продуктов, загрязненных на разных уровнях, и на контрольных материалах.

Значения, полученные на основе этого межлабораторного испытания, не могут применяться к пределам концентрации и матрицам, отличным от приведенных здесь.

10.2.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя отдельными (\log_{10} -преобразованными) результатами испытаний (число *S. perfringens* на г или см³) или отношение большего к меньшему из двух результатов по нормальной шкале, полученных при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале, одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование, в течение короткого допустимого промежутка времени, будет превышать предел повторяемости (r) не более чем в 5 % случаев.

В качестве общего показателя повторяемости (r) при испытании проб пищевых продуктов допускается использовать следующие значения. Эти значения r являются общими для всех матриц, рассматриваемых в процессе межлабораторного испытания:

- $r = 0,21$ для подтверждения LS или $0,25$ для подтверждения MN/LG (выраженные как разница между \log_{10} -преобразованными результатами испытания) или
- $r = 1,67$ для подтверждения LS или $1,8$ для подтверждения MN/LG (выраженные как отношение большего к меньшему из двух результатов испытания).

Для контрольных материалов (см. таблицу А.4) могут применяться следующие значения:

- $r = 0,13$ для подтверждения LS или $0,12$ для подтверждения MN/LG (выраженные как разница между \log_{10} -преобразованными результатами испытания) или
- $r = 1,3$ для подтверждения LS или $1,8$ для подтверждения MN/LG (выраженные как отношение большего к меньшему из двух результатов испытания).

Пример

Получен первый результат 10000 или $1,0 \times 10^4$ предполагаемых бактерий *S. perfringens* на грамм продукта. В условиях повторяемости отношение большего результата к меньшему не должно быть выше 1,9. Следовательно, второй результат будет между 5263 (= $10000/1,9$) и 19000 ($10000 \times 1,9$) предполагаемых бактерий *S. perfringens* на грамм.

10.2.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными (\log_{10} -преобразованными) результатами испытаний (число *S. perfringens* на г или см^3) или абсолютное соотношение между результатами двух испытаний по нормальной шкале, полученными при использовании одного и того же метода, на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях, разными операторами, использующими различное оборудование, будут превышать предел воспроизводимости (R) не более чем в 5 % случаев.

В качестве показателя предела воспроизводимости (R) при испытании различных видов пищевых продуктов и контрольных материалов могут использоваться значения из таблицы 9. Эти значения r являются средними значениями, полученными в результате межлабораторного испытания для различных уровней¹⁾.

Т а б л и ц а 9 — Примеры значений для R

Вид пробы	Подтверждение LS		Подтверждение MN и LG	
	R (log)*	R^{**}	R (log)*	R^{**}
Сыр	0,26	1,8	0,31	2,1
Мясо	0,55	3,5	0,52	3,3
Сухой корм для животных	0,65	4,5	0,72	5,3
Контрольный материал	0,27	1,9	0,29	1,9

* R (log) — предел воспроизводимости, выраженный как разность между \log_{10} -трансформированными результатами испытаний.
 ** R — предел воспроизводимости, выраженный как соотношение между результатами испытаний.

Примеры

1 Во-первых, лаборатория нашла результат испытания, равный 10000 или $1,0 \times 10^4$ *S. perfringens* на грамм сыра. В условиях воспроизводимости отношение большего результата к меньшему не должно быть выше 2,1. Следовательно, результат второй лаборатории должен быть между 4761 (= $10000/2,1$) и 21000 ($10000 \times 2,1$) предполагаемых бактерий *S. perfringens* на грамм.

2 Во-вторых, лаборатория хочет знать максимальный уровень, который она может найти и который соответствует установленному уровню (например предел в 100000 или $\log_{10}5$). Для этого значение R ($0,31 \times 0,59$) является разностью между \log_{10} -трансформированными результатами испытаний, а значение $1,52$ ($10^{0,18}$) представляет соотношение между результатами испытаний. Следовательно, результаты до $\log_{10}5,18$ ($\log_{10}5 + \log_{10}0,18$) или 152000 ($100000 \times 1,52$) не указывают несоответствие пределу. Коэффициент 0,59 отражает тот факт, что испытание с односторонним 95 %-ным интервалом проводят для того, чтобы узнать, превышен ли предел. Коэффициент 0,59 вычислен по формуле

$$0,59 = \frac{1,64}{1,96\sqrt{2}}$$

¹⁾ В случае данного межлабораторного испытания значения воспроизводимости, которые должны быть выражены как общее значение, применимое ко всем пробам продуктов, очень сильно отличаются между пробами.

11 Протокол испытания

В протоколе испытания указывают:

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

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторного испытания

Межлабораторное совместное испытание [1], в котором принимали участие 17 лабораторий из 15 стран, проводилось на пробах сыра, мяса, сухого корма для животных и контрольном материале. Каждая проба пищевых продуктов/кормов для животных была испытана на трех различных уровнях загрязнения бактериями *Clostridium perfringens*.

В соответствии с [2] в процессе межлабораторного испытания были получены следующие параметры. Испытание было организовано Голландским национальным институтом общественного здоровья (RIVM) в январе 2000 г. и дало данные по сходимости, приведенные в таблицах А.1—А.4.

Т а б л и ц а А.1 — Результаты анализа данных, полученных на пробах сыра

Проба	Сыр (низкий уровень)	Сыр (средний уровень)	Сыр (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0
Число принятых проб	26	26	26
Среднее значение \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,5/2,5 ^a	3,5/3,5 ^a	4,5/4,5 ^a
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,11/0,11 ^a	0,06/0,07 ^a	0,08/0,10 ^a
Среднее относительное отклонение повторяемости, %	4,37/4,59 ^a	1,63/1,97 ^a	1,85/2,31 ^a
Предел повторяемости r : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,30/0,32 ^a 2,0/2,1 ^a	0,16/0,19 ^a 1,5/1,6 ^a	0,23/0,29 ^a 1,7/1,9 ^a
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,13/0,13 ^a	0,08/0,15 ^a	0,11/0,14 ^a
Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	5,21/5,11 ^a	2,32/4,38 ^a	2,50/3,11 ^a
Предел повторяемости R : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,36/0,35 ^a 2,3/2,2 ^a	0,23/0,43 ^a 1,7/2,7 ^a	0,31/0,39 ^a 2,1/2,4 ^a
^a Первый результат был получен с использованием лактозо-желатиновой среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Т а б л и ц а А.2 — Результаты анализа данных, полученных на пробах мясного фарша

Проба	Мясной фарш (низкий уровень)	Мясной фарш (средний уровень)	Мясной фарш (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0

Окончание таблицы А.2

Проба	Мясной фарш (низкий уровень)	Мясной фарш (средний уровень)	Мясной фарш (высокий уровень)
Число принятых проб	26	26	26
Среднее значение \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,7/2,7 ^a	3,6/3,6 ^a	4,5/4,5 ^a
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,06/0,11 ^a	0,06/0,10 ^a	0,11/0,09 ^a
Среднее относительное отклонение повторяемости, %	2,32/4,22 ^a	1,67/2,70 ^a	2,33/2,01 ^a
Предел повторяемости g : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,18/0,32 ^a 1,5/2,1 ^a	0,17/0,27 ^a 1,5/1,9 ^a	0,29/0,25 ^a 2,0/1,8 ^a
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,14/0,18 ^a	0,18/0,18 ^a	0,18/0,22 ^a
Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	5,01/6,54 ^a	5,07/5,05 ^a	3,90/4,76 ^a
Предел повторяемости R : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,38/0,49 ^a 2,4/3,1 ^a	0,51/0,50 ^a 3,2/3,2 ^a	0,49/0,60 ^a 3,1/4,0 ^a
^a Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Т а б л и ц а А.3 — Результаты анализа данных, полученных на пробах сухого корма для животных

Проба	Сухой корм (низкий уровень)	Сухой корм (средний уровень)	Сухой корм (высокий уровень)
Число лабораторий с положительными результатами	13	13	13
Число проб	2	2	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13	13	13
Число выбросов	0	0	0
Число принятых проб	25	25	25
Среднее значение \bar{x} (\log_{10} cfu/g)	2,6/2,6 ^a	3,8/3,9 ^a	4,8/4,9 ^a
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,07/0,10 ^a	0,08/0,08 ^a	0,06/0,04 ^a
Среднее относительное отклонение повторяемости, %	2,85/3,79 ^a	2,09/1,93 ^a	1,22/0,75 ^a
Предел повторяемости g : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,21/0,28 ^a 1,6/1,9 ^a	0,22/0,21 ^a 1,7/1,6 ^a	0,16/0,10 ^a 1,5/1,3 ^a
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R (\log_{10} cfu/g)	0,32/0,32 ^a	0,25/0,24 ^a	0,17/0,17 ^a
Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	12,21/12,03 ^a	6,53/6,18 ^a	3,50/3,49 ^a
Предел повторяемости R : - как разность по шкале \log_{10} (\log_{10} cfu/g) - как соотношение по нормальной шкале	0,88/0,88 ^a 7,6/7,6 ^a	0,69/0,67 ^a 4,9/4,7 ^a	0,47/0,47 ^a 3,03/3,0 ^a
^a Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.			

Т а б л и ц а А.4 — Результаты анализа данных, полученных на контрольном материале

Проба	Контрольный материал
Число лабораторий с положительными результатами	13
Число проб	2
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	13
Число выбросов	0
Число принятых проб	26
Среднее значение \bar{x} ($\log_{10}\text{cfu/g}$)	3,7/3,7 ^a
Среднеквадратическое отклонение повторяемости s_R ($\log_{10}\text{cfu/capsule}$) Среднее относительное отклонение повторяемости, %	0,05/0,5 ^a 1,24/1,21 ^a
Предел повторяемости r : - как разность по шкале \log_{10} ($\log_{10}\text{cfu/capsule}$) - как соотношение по нормальной шкале	0,13/0,12 ^a 1,3/1,3 ^a
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости s_R ($\log_{10}\text{cfu/capsule}$) Среднее относительное отклонение воспроизводимости, %	0,09/0,09 ^a 2,51/2,39 ^a
Предел повторяемости R : - как разность по шкале \log_{10} ($\log_{10}\text{cfu/capsule}$) - как соотношение по нормальной шкале	0,26/0,25 ^a 1,8/1,6 ^a
^a Первый результат был получен с использованием лактозо-сульфитной среды, а второй — с использованием подвижной нитратной и лактозо-желатиновой среды.	

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 национального стандарта Российской Федерации	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта и условное обозначение степени его соответствия ссылочному национальному стандарту
ГОСТ Р ИСО 7218—2008	ИСО 7218—2007 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям» (IDT)
ГОСТ Р ИСО 11133-1—2008	ИСО 11133-1—2000 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории» (IDT)
ГОСТ Р ИСО 11133-2—2008	ИСО 11133-2—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 2. Практическое руководство по определению эффективности питательных сред» (IDT)
ГОСТ Р 51426—99 (ИСО 6887—83)	ИСО 6887-1—1999 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений» (MOD); ИСО 6887-2—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 2. Специальные правила для приготовления мяса и мясных продуктов» (MOD); ИСО 6887-3—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 3. Специальные правила для приготовления рыбы и рыбных продуктов» (MOD); ИСО 6887-4—2003 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 4. Специальные правила для приготовления продуктов, кроме молока и молочных продуктов, мяса и мясных продуктов и рыбы и рыбопродуктов» (MOD)
ГОСТ Р 51448—90 (ИСО 3100-2—88)	ИСО 3100-2—88* «Мясо и мясные продукты. Отбор и подготовка опытных проб. Часть 2. Подготовка опытных проб для микробиологического исследования» (MOD)
<p>Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IDT — идентичные стандарты; - MOD — модифицированные стандарты. 	

* Заменен на ИСО 6887-2:2003.

Библиография

- [1] Schulten S.M., Benschop E., Nagelkerke N.J.D. и Mooijman K.A. Validation of microbiological methods: Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937 (второе издание, 1997). Отчет 286555002, Национальный институт общественного здоровья и окружающей среды, Bilthoven, Нидерланды, 2001
- [2] ИСО 16140:2003 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол проверки достоверности альтернативных методов

Ключевые слова: пищевые продукты, корма, микробиология, горизонтальный метод обнаружения, presumptивные бактерии, наиболее вероятное число, бактерии *Clostridium perfringens*

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 02.11.2009. Подписано в печать 07.12.2009. Формат 60x84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,65. Тираж 298 экз. Зак. 842.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6