ГОСТ Р 50454—92
(ИСО 3811—79)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение и учет предполагаемых колиформных бактерий и Escherichia coli (арбитражный метод)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

УДК 637.525.001.4:006.354 Группа Н19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение и учет предполагаемых колиформных бактерий и Escherichia coli (арбитражный метод)

Meat and meat products. Detection and enumeration of presumptive coliform bacteria and presumptive Escherichia coli (Reference method)

ОКС 67.120.10
ОКСТУ 9209

ГОСТ Р 50454—92

(ИСО 3811—79)

Дата введения 1994—01—01

1 Назначение и область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод обнаружения и учета предполагаемых колиформных бактерий и Escherichia coli (E. coli) в мясе и мясных продуктах.

2 Ссылки

ГОСТ Р 50455—92 (ИСО 3565—75) Мясо и мясные продукты. Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод)

ГОСТ Р 51447—99 (ИСО 3100-1—91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

3 Определения

3.1 Предполагаемые колиформные бактерии — микроорганизмы, ферментирующие лактозу с образованием газа при 30 °С, обнаруженные при проведении анализа в соответствии с указанным методом.

3.2 Предполагаемые Escherichia coli — предполагаемые колиформные бактерии, ферментирующие лактозу с образованием газа при 44 °С и продуцирующие индол из триптофана при 44 °С, обнаруженные при проведении анализа в соответствии с указанным методом.

3.3 Подсчет предполагаемых колиформных бактерий и Escherichia coli, обнаруженных в 1 г мяса или мясных продуктов при проведении анализа в соответствии с указанным методом.

4 Сущность метода

Измельчение испытуемой пробы с последующей гомогенизацией навески в стерильном разбавителе. Приготовление из гомогената десятикратных разведений, из которых делают посев в ряд пробирок с жидкой селективной средой. По количеству пробирок, показывающих образование газа после выдерживания в термостате при температуре 30 °С, определяют наиболее вероятное число предполагаемых колиформных бактерий в 1 г продукта, используя таблицу НВЧ (см. приложение).

Для учета предполагаемых E. coli делают посев из положительных пробирок (т. е. пробирок, показывающих образование газа) в пробирки с жидкой селективной средой и в пробирки с триптоновой водой и выдерживают в термостате при температуре 44 °С. По количеству пробирок, показывающих образование газа в селективной среде и образование индола в триптоновой воде, определяют наиболее вероятное число предполагаемых E. coli, используя таблицу НВЧ (см. приложение).

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992
© СТАНДАРТИНФОРМ, 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

5 Питательные среды, жидкость для разбавления и реактивы

5.1 Основные материалы

Для получения сопоставительных результатов рекомендуется использовать безводные компоненты питательных сред одинакового качества, химические реактивы аналитического качества или сухие готовые среды. Используемая вода должна быть дистиллированной или, по крайней мере, эквивалентной чистоты.

5.2 Питательные среды

5.2.1 Лактозный бульон с желчью и бриллиантовым зеленым (селективная среда)

Состав:

	а — среда двойной концентрации	*б* — среда одинарной концентрации
пептон	20,0 г	10,0 г
лактоза	20,0 г	10,0 г
бычья желчь (сухая)	40,0 г	20,0 г
бриллиантовый зеленый по ГОСТ Р 50455	0,0266 г	0,0133 г
вода	1000 см^3	1000 см^3

Примечание — Ввиду того, что готовая среда может не всегда давать ожидаемый результат, ее качество должно быть проверено перед употреблением.

Приготовление. Компоненты или сухую готовую среду растворяют в кипящей воде. Устанавливают pH среды раствором гидроксида натрия или раствором соляной кислоты подходящей концентрации так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,2±0,1) при 25 °С. Среду по 10 см^3 переносят в бактериологические пробирки (16 × 160 мм — для среды одинарной концентрации или 20 × 200 мм — для среды двойной концентрации), в которые помещают трубки Дархема, или во флаконы с завинчивающимися пробками подобной вместимости. Стерилизуют среду при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. Над жидкостью должно быть видно не менее 1 см трубки Дархема. При наличии пузырьков их удаляют, наклоняя и постукивая пробирки. Пробирки, содержащие газовые пузырьки, не используют.

5.2.2 Триптоновая вода

Состав:

триптон . . . . . 10,0 г;
хлорид натрия . . . . . 5,0 г;
вода . . . . . 1000 см^3.

Приготовление. Компоненты или сухую готовую среду растворяют в горячей воде. Устанавливают pH среды раствором гидроксида натрия или раствором соляной кислоты подходящей концентрации так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,3±0,1) при 25 °С. Среду по 5—10 см^3 переносят в бактериологические пробирки или флаконы с завинчивающимися пробками аналогичной вместимости и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

5.3 Жидкость для разбавления

Состав:

пептон . . . . . 1,0 г;
хлорид натрия . . . . . 8,5 г;
вода . . . . . 1000 см^3.

Приготовление. Компоненты или сухую готовую среду растворяют в кипящей воде. Устанавливают pH раствором гидроксида натрия или раствором соляной кислоты подходящей концентрации так, чтобы после стерилизации его значение составляло (7,0±0,1) при 25 °С. Часть жидкости по 100—300 см^3 переносят в колбы или флаконы с завинчивающимися пробками вместимостью вдвое больше объема жидкости. Остаток жидкости переносят в пробирки, маленькие колбы или маленькие флаконы с завинчивающимися пробками так, чтобы после стерилизации каждая содержала по 9,0 см^3. Стерилизуют жидкость для разбавления при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

5.4 Индольный реактив (реактив Ковача)

Состав:

р-диметиламинобензальдегид . . . . . 5,0 г;
амиловый спирт . . . . . 25,0 см^3;

соляная кислота (ρ_{20} 1,18—1,19 г/см^3) . . . . . 25,0 см^3.

Приготовление. Альдегид растворяют в спирте при слабом нагревании на водяной бане (около 50—55 °С). Охлаждают и добавляют кислоту. Хранят при температуре около 4 °С в сосуде из темного стекла. Цвет реактива должен быть от светло-желтого до светло-коричневого.

6 Аппаратура и стеклянная посуда

6.1 Аппаратура

6.1.1 Механическая мясорубка лабораторного типа, стерильная, с решеткой, диаметр отверстий которой не более 4 мм.

6.1.2 Механический смеситель, работающий со скоростью не менее 8000 об/мин и не более 45000 об/мин, со стеклянными или металлическими смесительными стаканами разной вместимости и устойчивыми к условиям стерилизации.

6.1.3 Аппаратура для стерилизации стеклянной посуды, смесительных стаканов, питательных сред и т. п.

6.1.4 Термостат для выдерживания пробирок с посевами при температуре (30±1) °С.

6.1.5 Водяная баня для выдерживания пробирок с посевами при температуре (44±0,1) °С.

6.2 Стеклянная посуда

Стеклянная посуда должна быть устойчивой к повторной стерилизации.

6.2.1 Колбы и бактериологические пробирки (16 × 160 мм и 20 × 200 мм).

Допускается использовать флаконы с завинчивающимися пробками аналогичной вместимости.

6.2.2 Градуированные пипетки, откалиброванные для бактериологических целей, вместимостью 1,0 и 10,0 см^3 с ценой деления соответственно 0,1 и 1 см^3 и диаметром выходного отверстия 2—3 мм.

6.3 Стерилизация стеклянной посуды

Стерилизуют стеклянную посуду одним из следующих способов:

влажная стерилизация при температуре (121±1) °С не менее 20 мин;

сухая стерилизация при температуре не менее 170 °С в течение 1 ч.

7 Отбор проб

Пробу отбирают массой не менее 200 г по ГОСТ Р 51447.

Отобранную пробу можно хранить в лаборатории при температуре 0—5 °С не более 1 ч.

8 Проведение анализа

8.1 Предварительная обработка проб

Пробу дважды пропускают через мясорубку, перемешивают и сразу приступают к анализу. При необходимости пробу можно хранить при температуре 0—5 °С не более 1 ч.

8.2 Навеска

Приблизительно 10 г измельченной пробы взвешивают с точностью 0,1 г в стерильном смесительном стакане.

8.3 Приготовление гомогената и разведений

8.3.1 Для приготовления гомогената (исходного разведения) к навеске продукта добавляют жидкость для разбавления в соотношении 1:9 (по массе) и гомогенизируют на смесителе не более 2,5 мин, при этом число оборотов смесителя должно составлять 15000—20000.

8.3.2 Последующие операции (8.3.3—8.3.5) выполняют одновременно на двух параллельных порциях гомогената (две серии разведений).

8.3.3 Непосредственно после гомогенизации стерильной пипеткой вместимостью 1 см^3 берут 1 см^3 гомогената и добавляют его в пробирку, содержащую 9 см^3 стерильной жидкости для разбавления, не касаясь пипеткой поверхности раствора.

8.3.4 Жидкости хорошо перемешивают новой стерильной пипеткой путем десятикратного наполнения и выдувания из нее содержимого пробирки. Переносят этой же пипеткой 1 см^3 полученного раствора (разведение 10^{-2}) в другую пробирку, содержащую 9 см^3 стерильной жидкости для разбавления, не касаясь пипеткой поверхности раствора.

8.3.5 Жидкости хорошо перемешивают новой стерильной пипеткой. Операции повторяют до тех пор, пока не получат разведение 10^{-6}.

8.4 Предполагаемые колиформные бактерии

8.4.1 Посев

Переносят новой стерильной пипеткой 6 порций по 1 см^3 гомогената (разделяя их на две трехкратные повторности) и в трехкратной повторности по 1 см^3 каждого из пяти последующих разведений (8.3.3—8.3.5) двух серий разведений в пробирки, содержащие по 10 см^3 селективного бульона одинарной концентрации (5.2.1б); начинают посев с наибольшего разведения гомогената и постепенно переходят к наименьшему, предварительно перемешивая содержимое пробирок трехкратным наполнением и выдуванием пипетки.

Если ожидается выявить очень маленькое количество колиформных бактерий, то таким же образом переносят 6 порций по 10 см^3 гомогената (две трехкратные повторности) в пробирки с 10 см^3 селективного бульона двойной концентрации (5.2.1а), используя стерильную пипетку вместимостью 10 см^3.

8.4.2 Инкубирование

Пробирки, приготовленные по 8.4.1, выдерживают в термостате при температуре (30±1) °С в течение (48±2) ч.

8.4.3 Интерпретация результатов

После выдерживания в термостате пробирки с посевом просматривают и отмечают положительные, то есть те, в которых наблюдается рост и образование газа, заполнившего не менее 1/10 объема трубки Дархема.

8.5 Предполагаемые Escherichia coli

8.5.1 Посев

Используя стерильную пипетку вместимостью 1 см^3 для каждой пробирки, делают посев 1 капли культуры из положительных пробирок с предполагаемыми колиформными бактериями (8.4.3) в пробирку с 10 см^3 бульона одинарной концентрации (5.2.1б) и в пробирку с 10 см^3 триптоновой воды, предварительно подогревая среды до 44 °С.

8.5.2 Инкубирование

Пробирки, приготовленные по п. 8.5.1, выдерживают на водяной бане при температуре (44±0,1) °С в течение 48 ч.

8.5.3 Интерпретация результатов

8.5.3.1 Образование газа

Пробирки, содержащие бульон с посевом, после инкубирования в течение 48 ч просматривают.

Регистрируют как положительные те пробирки, в которых наблюдается рост и образование газа, заполнившего не менее 1/10 объема трубки Дархема.

8.5.3.2 Образование индола

В пробирки, содержащие триптоновую воду с посевом, после инкубирования в течение 48 ч добавляют 0,5 см^3 индольного реактива, хорошо встряхивают и исследуют по истечении 1 мин.

Красное окрашивание спиртового слоя указывает на присутствие индола.

Регистрируют как положительные те пробирки, в которых образовался индол.

9 Обработка результатов

9.1 Предполагаемые колиформные бактерии

9.1.1 По количеству положительных пробирок с предполагаемыми колиформными бактериями (8.4.3) для различных разведений рассчитывают наиболее вероятное число (НВЧ) этих микроорганизмов на 1 г мяса или мясного продукта, как указано в 9.1.2—9.1.4.

9.1.2 Для расчета НВЧ выбирают три последовательных разведения в соответствии с одним из следующих правил:

а) когда есть разведение, дающее три положительные пробирки, выбирают наибольшее разведение (наименьшей концентрации), дающее три положительные пробирки, и два последующих разведения (концентрацией 1/10 и 1/100 выбранного разведения).

Если последующие разведения оказались недостаточными в сравнении с наибольшим, дающим три положительные пробирки, выбирают три наибольших разведения серии;

б) когда нет разведения, дающего три положительные пробирки выбирают три наибольших разведения серии;

в) особый случай — когда более одного из трех разведений, выбранных по правилам, указанным в подпунктах *а* и *б*, не дали положительных пробирок.

Выбирают из этих разведений наименьшее (наибольшей концентрации), не дающее положительных пробирок, и два последующих разведения серии (концентрацией 1/10 и 1/100 выбранного разведения), за исключением того случая, когда положительные пробирки обнаружены на уровне исходного разведения пробы. В последнем случае необходимо выбрать первые три разведения для расчета НВЧ, даже если эти серии включают два разведения, не дающих положительные пробирки.

9.1.3 Для определения значения НВЧ предполагаемых колиформных бактерий на 1 г мяса или мясного продукта умножить показатель НВЧ, приведенный в таблице (см. приложение), на значение, обратное наименьшему разведению.

Если выбранное наименьшее разведение соответствует пробиркам со средой двойной концентрации и посевом 10 $см^3$, показатель НВЧ следует разделить на 10.

9.1.4 Рассчитывают среднее значение результатов, полученных для каждой серии разведений.

9.2 Предполагаемые Escherichia coli

9.2.1 По количеству положительных пробирок с предполагаемыми колиформными бактериями, в которых отмечено образование газа и образование индола, в различных разведениях рассчитывают НВЧ этих микроорганизмов на 1 г мяса или мясного продукта, как указано в 9.1.2—9.1.4 (при этом читать вместо «колиформные бактерии» «Escherichia coli»).

9.3 Запись результатов

Результат записывают как НВЧ предполагаемых колиформных бактерий (или Escherichia coli) на 1 г мяса или мясного продукта.

При значении показателя НВЧ более 100 микроорганизмов на 1 г, результат выражают как число от 1,0 до 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени (например, среднее число 15000 записывается как $1{,}5 \cdot 10^4$). При значении НВЧ от 0,3 до 100, результат выражают в соответствии с расчетом. При значении НВЧ меньше 0,3 при использовании методики для малого количества колиформных бактерий (8.4.1), результат выражают следующим образом: предполагаемые колиформные бактерии (или предполагаемые Escherichia coli) не были обнаружены в 1 г мяса или мясного продукта.

10 Отчет об испытаниях

В отчете должны быть указаны используемый метод и полученный результат, а также все условия, не оговоренные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, а также те, которые могли повлиять на результат.

В отчете должны быть приведены все детали, необходимые для полной идентификации пробы.

ПРИЛОЖЕНИЕ
(обязательное)

ТАБЛИЦА
для определения показателя НВЧ при проведении анализа одного образца из партии

Число положительных пробирок для трех выбранных разведений			Показатель НВЧ	Категория*	Пределы достоверности, %			
1-е	2-е	3-е			95		99	
0	0	0	< 0,3					
0	0	1		0				
0	1	0	0,3	2	< 0,1	1,7	<0,1	2,3
0	2	0		0				
1	0	0	0,4	1	0,1	2,1	<0,1	2,8
1	0	1	0,7	2	0,2	2,7	0,1	3,5
1	1	0	0,7	1	0,2	2,8	<0,1	3,6
1	1	1		0				
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5	0,2	4,4
1	2	1		0				
1	3	0		0				
2	0	0	0,9	1	0,2	3,8	<0,1	5,0
2	0	1	1,4	2	0,5	4,8	0,2	6,2
2	1	0	1,5	1	0,5	5,0	0,2	6,4
2	1	1	2,0	2	0,7	6,0	0,4	7,6
2	2	0	2,1	1	0,8	6,2	0,5	7,9
2	2	1		0				
2	3	0		0				
3	0	0	2	1	<1	13	<1	18
3	0	1	4	1	1	18	<1	23
3	0	2		0				
3	1	0	4	1	1	21	<1	28
3	1	1	7	1	2	28	2	36
3	1	2		0				
3	2	0	9	1	3	38	1	51
3	2	1	15	1	5	50	3	66
3	2	2	21	2	8	64	5	82
3	2	3		0				
3	3	0	20	1	<10	140	<10	190
3	3	1	50	1	10	240	<10	320
3	3	2	110	1	30	480	20	640
3	3	3	>110					

* Категория 0 — неприемлемые комбинации пробирок, дающие в нормальных условиях наименьший шанс получения результата. Комбинации, не упомянутые в таблице, также относятся к этой категории. При получении такой комбинации вероятно была допущена ошибка, использован неправильный метод или в продукте присутствует бактериостатическое вещество.

Категория 1 — наиболее вероятные комбинации пробирок, которые могут быть получены в 95 % случаев.

Категория 2 — наиболее вероятные комбинации пробирок в сравнении с категорией 1, которые могут быть получены в 4 % случаев.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 226 «Мясо и мясная продукция»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 25 декабря 1992 г. № 1567

Настоящий стандарт подготовлен методом прямого применения международного стандарта ИСО 3811—79 Мясо и мясные продукты. Обнаружение и подсчет количества предполагаемых колибактерий и кишечной палочки (контрольный метод) и полностью ему соответствует

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Январь 2010 г.