

## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

### МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

#### Подсчет количества презумптивных *Pseudomonas spp.*

Meat and meat products. Enumeration of presumptive *Pseudomonas spp.*

---

Дата введения –

#### 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо и мясные продукты, включая мясо птицы и устанавливает метод подсчета количества презумптивных *Pseudomonas spp.*

#### 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ИСО 6887-1 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

ISO 6887-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ИСО 6887-2 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

*Проект, окончательная редакция*

ISO 6887-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ИСО 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations

ИСО 11133-1 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

ISO/TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ИСО 11133-2 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 2. Практическое руководство по определению эффективности питательных сред

ISO/TS 11133-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

**Примечание 1** – Для однозначного соблюдения требований настоящего стандарта, выраженных в датированных ссылках, рекомендуется использовать только данный ссылочный стандарт. Для недатированных документов действительны последние редакции (включая поправки).

### **3 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением.

**3.1 презумптивные *Pseudomonas spp.*** (presumptive *Pseudomonas spp.*): Бактерии, которые при температуре культивирования 25 °С образуют колонии на цефалотин-фуцидин натрия-цетримидном агаре (CFC агар) и дают положительную

реакцию на оксидазу при проведении исследования в соответствии с настоящим стандартом.

#### 4 Сущность метода

Метод подсчета количества презумптивных *Pseudomonas spp.* основан на высеве определенного количества приготовленной исходной суспензии продукта и десятикратных разведений исходной суспензии на плотную селективную среду, CFC агар; инкубации посевов при температуре 25 °С в течение (44 ± 4) ч, подтверждении на наличие оксидазы (оксидазоположительные).

Количество презумптивных *Pseudomonas spp.* в 1 г (см<sup>3</sup>) исследуемого образца рассчитывают из числа подтвержденных колоний на чашке с CFC агаром.

### 5 Приготовление разведений, питательных сред и реактивов

#### 5.1 Общие требования

Общие правила проведения лабораторных исследований должны удовлетворять требованиям ИСО 7218; подготовка и тестирование питательных сред – ИСО 11133-1 и ИСО 11133-2.

#### 5.2 Приготовление разведений

Приготовление разведений проводят в соответствии с ИСО 6887-1 и ИСО 6887-2.

#### 5.3 Цефалотин–фуцидин натрия–цетримидин агар (CFC агар) [3]

##### 5.3.1 Основа среды

###### 5.3.1.1 Состав:

ферментативный перевар желатина	– 16,0 г;
ферментативный перевар казеина	– 10,0 г;
сульфат калия (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	– 10,0 г;
хлорид магния (MgCl <sub>2</sub> )	– 1,4 г;
агар*	– от 12,0 до 18,0 г;
дистиллированная вода	– 1000 см <sup>3</sup> .

\*) Используемая масса зависит от прочности геля агара.

### 5.3.1.2 Приготовление

Компоненты или сухую готовую среду растворяют при нагревании в дистиллированной воде.

Устанавливают рН среды (6.4) таким образом, чтобы после стерилизации его значение было  $7,2 \pm 0,2$  при температуре 25 °С. Разливают основу питательной среды в колбы или флаконы соответствующего объема (6.6) и стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре 121 °С течение 15 мин.

## 5.3.2 Растворы ингибиторов

Растворы хранят при температуре  $(5 \pm 3)$  °С не более 7 сут.

### 5.3.2.1 Раствор цефалотина

#### 5.3.2.1.1 Состав:

цефалотин натриевая соль – 0,1 г;  
дистиллированная вода – 100 см<sup>3</sup>.

#### 5.3.2.1.2 Приготовление

Натриевую соль цефалотина растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

### 5.3.2.2 Раствор фуцидин натрия

#### 5.3.2.2.1 Состав:

фуцидин натрия – 0,1 г;  
дистиллированная вода – 100 см<sup>3</sup>.

#### 5.3.2.2.2 Приготовление

Фуцидин натрия растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

### 5.3.2.3 Раствор цетримиды

#### 5.3.2.3.1 Состав:

цетримид\* – 0,1 г;  
дистиллированная вода – 100 см<sup>3</sup>.

---

\* Смесь состоит в основном из тетрадецилтриметиламмония бромида с небольшим количеством додецилтриметиламмония бромида и цетримония (гексадецилтриметиламмония) бромида

#### 5.3.2.3.2 Приготовление

Растворяют цетримид в дистиллированной воде и стерилизуют раствор путем фильтрования.

### 5.3.3 Готовая среда

#### 5.3.3.1 Состав среды

	Объем, см <sup>3</sup>	Концентрация, мг/ см <sup>3</sup>
Основа питательной среды (5.3.1)	100	-
Раствор цефалотина (5.3.2.1)	5	50
Раствор фуцидин натрия(5.3.2.2)	1	10
Раствор цетримида(5.3.2.3)	1	10

#### 5.3.3.2 Приготовление

В основу питательной среды, охлажденную на водяной бане (6.3) до температуры  $(47 \pm 2)$  °С, добавляют растворы ингибиторов и тщательно перемешивают.

### 5.3.4 Приготовление чашек с СФС агаром

В стерильные чашки Петри (6.8) разливают готовую среду приблизительно по 15 см<sup>3</sup> и дают агару затвердеть.

Непосредственно перед применением среда в чашках должна быть подсушена в соответствии с ИСО 11133-1.

Неподсушенную среду в чашках хранят при температуре  $(5 \pm 3)$  °С не более четырех недель.

### 5.3.5 Определение эффективности питательной среды

Определение селективности и продуктивности среды проводят в соответствии с ИСО 11133-1. Эффективность СФС агара должна быть определена по методам и критериям в соответствии с ИСО 11133-2.

#### 5.3.5.1 Определение продуктивности

Инкубация: при температуре 25 °С в течение  $(44 \pm 4)$  ч.

Штаммы: *Pseudomonas fluorescens* WDCM 00115\* или

*Pseudomonas flagi* WDCM 00116\*.

Эталонная среда: трипказо-соевый агар (TSA) .

Метод контроля: количественный.

Критерий: коэффициент продуктивности  $P_R \geq 0,5$ .

#### 5.3.5.2 Определение селективности

Инкубация: при температуре 25 °С в течение (44 ± 4) ч.

Штаммы: *Escherichia coli* WDCM 00013\*.

Метод контроля: количественный.

Критерий: полное ингибирование роста.

### 5.4 Реактив для определения оксидазы

#### 5.4.1 Состав:

*N, N, N', N'* – Тетраметил-*p*-фенилендиамин дигидрохлорид – 1,0 г;

дистиллированная вода – 100 см<sup>3</sup>.

#### 5.4.2 Приготовление

Растворяют реактив в дистиллированной воде непосредственно перед применением. Могут быть использованы готовые (имеющиеся в продаже) диски или пластинки. В этом случае следуют рекомендациям изготовителя.

## 6 Оборудование

Используют лабораторное оборудование для микробиологических исследований в соответствии с ИСО 7218, и, в частности следующее:

**6.1 Термостат для сухой стерилизации или автоклав** для влажной стерилизации.

**6.2 Термостат**, поддерживающий температуру (25 ± 1) °С.

**6.3 Баня водяная**, поддерживающая температуру (47 ± 2) °С.

**6.4 рН-метр** с точностью измерения ± 0,05 единиц.

---

\* или штаммы с аналогичными свойствами. Справочный каталог штаммов, доступный на <http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM> Reference Strain Catalogue для информации о коллекции культур ряда штаммов и детали контактов

**6.5 Петли**, изготовленные из платиново-иридиевого сплава или эквивалентные стерильные одноразовые петли.

**6.6 Пробирки, бутылки или колбы** необходимого объема.

**6.7 Пипетки градуированные, стерильные**, вместимостью 1 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup> по ИСО 835 класса А [1], или автоматические пипетки по ИСО 8655-2 [2], с использованием стерильных наконечников.

**6.8 Чашки Петри стеклянные или пластиковые** диаметром от 90 до 100 мм.

**6.9 Шпатели стеклянные или пластиковые**, например, шпатель стеклянный формы хоккейной клюшки, диаметром 3,5 мм и длиной 200 мм, имеющий изгиб под прямым углом приблизительно 30 мм от одного конца и с оплавленными концами.

## **7 Отбор проб**

Метод отбора проб не входит в настоящий стандарт. При отсутствии стандарта, описывающего отбор проб исследуемого продукта, пробы отбирают по специальному соглашению между заинтересованными сторонами.

Следует обеспечить условия, чтобы лаборатория получила пробы, которые были бы представительными и не были повреждены или изменены при транспортировании или хранении (см. ИСО 7218).

## **8 Подготовка проб**

Подготовку проб проводят в соответствии с ИСО 6887-1 и ИСО 6887-2 и/или по специализированным стандартам, разработанных для рассматриваемых групп продукции, или по специальному соглашению между заинтересованными сторонами.

## **9 Порядок проведения испытаний**

### **9.1 Навеска, исходная суспензия и разведения**

Приготовление исходной суспензии и разведений проводят в соответствии с ИСО 6887-2.

### **9.2 Посев и инкубация**

**9.2.1** В соответствии с ИСО 7218, для одного разведения должна использоваться одна чашка с агаром, и, по крайней мере, два последовательных разведения. При использовании только одного разведения берут две чашки с агаром.

**9.2.2** В чашку с CFC агаром (5.3.4) с помощью пипетки (6.7) вносят 0,1 см<sup>3</sup> исходной суспензии. В другую чашку с CFC агаром вносят 0,1 см<sup>3</sup> первого десятикратного разведения исходной суспензии.

Эти операции повторяют с последующими разведениями, используя для каждого десятикратного разведения чистую стерильную пипетку.

**9.2.3** Посевной материал растирают по поверхности агара шпателем (6.9) до тех пор, пока он не станет абсолютно сухим.

**9.2.4** Чашки с посевами инкубируют дном вверх в термостате (6.2) при температуре 25 °С в течение (44 ± 4) ч.

### **9.3 Подсчет и отбор колоний**

После инкубирования отбирают чашки, содержащие менее 150 колоний.

Произвольно отбирают по пять колоний, включая все типы колоний, от каждой выбранной для подтверждения чашки.

### **9.4 Идентификация**

#### **9.4.1 Оксидазный тест**

Увлажняют часть фильтровальной бумаги оксидазным реактивом (5.4.2). Берут материал из отобранной колонии, используя для этого петлю из платиново - иридиевого сплава или пластмассовую (никель-хромовая петля дает ошибочные положительные результаты) (6.5) и наносят ее на увлажненную фильтровальную бумагу.

Если оксидаза присутствует, фиолетовое окрашивание появляется в течение 5-10 сек. Если после 30 сек цвет не изменился, тест на оксидазу считается отрицательной.

Результаты подтверждают, используя положительные и отрицательные контрольные штаммы микроорганизмов. Примерами контрольных штаммов могут быть *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025 (положительный контроль), *Escherichia coli* WDCM 00013 (отрицательный контроль).

#### **9.4.2 Оценка результатов**

Колонии, которые дают положительную реакцию на оксидазу, считают презумтивными *Pseudomonas spp.*

#### **10 Обработка результатов**

Обработку результатов проводят в соответствии с ИСО 7218.

#### **11 Оформление протокола испытаний**

Протокол испытаний должен содержать следующую информацию:

- a) всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- b) используемый метод исследования со ссылкой на настоящий стандарт;
- c) полученные результаты;
- d) все подробности проведения испытания, не предусмотренные настоящим стандартом или считающиеся необязательными, которые могут повлиять на результат.

## Библиография

[1] ИСО 835 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки (ISO 835 Laboratory glassware — Graduated pipettes)

[2] ИСО 8655-2 Устройства мерные, приводимые в действие поршнем Часть 2. Пипетки, приводимые в действие поршнем. (ISO 8655-2 Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston pipettes)

[3] MEAD, G.C., ADAMS, B.W. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. Br. Poult. Sci. 1977, 18, pp. 661-670

## Приложение ДА

(справочное)

### Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам)

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 6887-1	-	*
ИСО 6887-2	-	*
ИСО 7218	IDT	ГОСТ Р ИСО 7218-2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям
ИСО 11133-1	IDT	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
ИСО 11133-2	IDT	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
*Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов		
<p>П р и м е ч а н и е – В настоящей таблице использованы следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:</p> <p>– IDT – идентичные стандарты;</p>		

---

УДК 637.5.075:006.034

ОКС 67.120.10

Н 19

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, презумптивные *Pseudomonas spp.*, мясо птицы, СФС агар, оксидазный тест

---

Директор ГНУ ВНИИМП  
им. В.М. Горбатова  
Россельхозакадемии

А.Б. Лисицын

Зам. директора по научной работе

А.А. Семенова

Заведующий лабораторией гигиены  
производства и микробиологии

М.Ю. Минаев

Заместитель заведующего лабораторией  
гигиены производства и микробиологии

Д.С. Батаева

Заведующая отделом стандартизации,  
сертификации и систем управления  
качества

О.А. Кузнецова