

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

П р и м е ч а н и е 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^3) 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_2SO_4)	– 10,0 г;
хлорид магния (MgCl_2)	– 1,4 г;
агар*	– от 12,0 до 18,0 г;
дистиллированная вода	– 1000 см^3 .

*) 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 ± 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 см³.

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 см³.

5.3.2.2.2 Приготовление

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

5.3.2.3 Раствор цетримид

5.3.2.3.1 Состав:

цетримид* – 0,1 г;
дистиллированная вода – 100 см³.

* 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 ³	Концентрация, мг/ см ³
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 ± 2) °С, добавляют растворы ингибиторов и тщательно перемешивают.

5.3.4 Приготовление чашек с CFC агаром

В стерильные чашки Петри (6.8) разливают готовую среду приблизительно по 15 см³ 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 ± 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 CFC 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 ± 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 °C 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 см³.

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) °C.

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

6.4 pH-метр с точностью измерения $\pm 0,05$ 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 см³ с ценой деления 0,1 см³ 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 $0,1 \text{ см}^3$ исходной суспензии. В другую чашку с CFC агаром вносят $0,1 \text{ см}^3$ 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°C 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 презумптивными *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