
**Микробиология в цепи создания
пищевой продукции. Горизонтальный
метод подсчета микроорганизмов.**

Часть 1.

**Метод подсчета колоний при
температуре 30 °C при посеве заливкой**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration
of microorganisms —*

Part 1: Colony-count at 30 degrees C by the pour plate technique

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2dcb107b-8570-4c56-806d-a410d5c4b3bc/iso-4833-1-2013>



Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe – торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 4833-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2dcb167b-8570-4e56-808d-a410d5c4b3bc/iso-4833-1-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2013

Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 734 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Питательные среды и разбавители	2
5.1 Разбавители	2
5.2 Разбавители	2
5.3 Агар для подсчета колоний (PCA)	2
5.4 Среда, используемая в качестве верхнего слоя (если необходимо, см. 9.2.7)	3
6 Аппаратура	4
7 Отбор проб	4
8 Приготовление пробы для анализа	4
9 Проведение анализа	4
9.1 Проба для анализа, исходная суспензия и разведения	4
9.2 Посев и инкубация	5
9.3 Подсчет колоний	5
10 Обработка результатов	5
10.1 Метод вычисления	5
10.2 Прецизионность	5
10.3 Интерпретация результатов испытания	6
11 Протокол испытания	7
Приложение А (информативное) Применение критической разности для интерпретации результатов	8
Библиография	9

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) всемирная федерация национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по подготовке международных стандартов обычно ведется через технические комитеты ISO. Каждый комитет-член ISO, проявляющий интерес к тематике, по которой учрежден технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, государственные и негосударственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки данного документа, и процедуры, предусмотренные для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC, Часть 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, требуемые для различных типов документов ISO. Проект данного документа был разработан в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC, Часть 2. www.iso.org/directives.

Необходимо обратить внимание на возможность того, что ряд элементов данного документа могут быть предметом патентных прав. Международная организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке документа, будут указаны во Введении и/или в перечне полученных ISO объявлений о патентном праве. www.iso.org/patents.

Любое торговое название, использованное в данном документе, является информацией, предоставляемой для удобства пользователей, а не свидетельством в пользу того или иного товара или той или иной компании.

Технический комитет, несущий ответственность за данный документ, ISO/TC 24, *Пищевые продукты*, Подкомитет SC 9, *Микробиология*.

Настоящее первое издание наряду с ISO 4833-2 отменяет и заменяет ISO 4833:2003.

ISO 4833 состоит из следующих частей под общим названием *Микробиология в цепи создания пищевой продукции. Горизонтальный метод подсчета микроорганизмов*:

- *Часть 1. Метод подсчета колоний при температуре 30 °C при посеве заливкой;*
- *Часть 2. Метод подсчета колоний при температуре 30 °C при посеве на поверхность.*

Микробиология в цепи создания пищевой продукции. Горизонтальный метод подсчета микроорганизмов.

Часть 1.

Метод подсчета колоний при температуре 30°C при посеве заливкой

1 Область применения

Настоящая часть ISO 4833 устанавливает горизонтальный метод подсчета микроорганизмов, которые растут и образуют колонии на твердой среде после аэробной инкубации при температуре 30 °C. Этот метод применяется к

- a) продуктам, предназначенным для потребления человеком и животными;
- b) пробам окружающей среды в зоне производства и отгрузки пищевых продуктов и кормов для животных.

Данная часть ISO 4833 применяется также к

- 1) продукции, требующей надежного подсчета, когда установлен низкий предел обнаружения (ниже 10^2 /г или 10^2 /мл для жидких проб или ниже 10^3 /г для твердых проб);
- 2) продукции, для которой ожидается распространение колоний, которые скрывают колонии других микроорганизмов, например, молоко и молочные продукты могут содержать распространяющиеся *Bacillus* spp.

Применимость данной части ISO 4833 к изучению определенных сброженных пищевых продуктов и кормов для животных ограничена и более подходящими могут быть другие питательные среды и условия инкубации. В то же время данный метод можно применить и к такой продукции, даже если существует возможность, что преобладающие микроорганизмы в этих продуктах не будут эффективно обнаруживаться.

Для некоторых матриц метод, установленный в данной части ISO 4833, может давать результаты, отличающиеся от результатов, полученных методом, установленным в ISO 4833-2.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы являются обязательными при применении данного документа. Для датированных ссылок применяется только цитированное издание документа. Для недатированных ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 6887 (все части), *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований.*

ISO 7218, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие правила и руководство по проведению микробиологических исследований*

ISO 11133, *Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и проверка соответствия требованиям питательных сред*

3 Термины и определения

Применительно к данному документу используется следующие термины и определения.

3.1 микроорганизм
microorganism
организм микроскопического размера, включая бактерии, грибы и плесень, простейшие (одноклеточные) и вирусы

[ИСТОЧНИК: ISO/TS 11139:2006,³2.26]

Примечание 1 к статье: В данной части ISO 4833 микроорганизмами являются бактерии, дрожжи и плесени, которые способны создавать колонии в условиях, установленных в данной части ISO 4833.

4 Сущность метода

Установленное количество жидкой пробы или установленное количество исходной суспензии в случае других продуктов заливают в пустую чашку Петри и перемешивают с установленной питательной средой на расплавленном агар-агаре, чтобы получить засеянный застывший агар.

Готовят еще несколько чашек в таких же условиях, используя десятичные разбавления испытуемой пробы или исходной суспензии.

Чашки подвергают аэробной инкубации при температуре 30 °C в течение 72 ч.

Количество микроорганизмов на миллилитр или грамм пробы рассчитывают по числу колоний, полученных на чашках, содержащих меньше 300 колоний.

5 Питательные среды и разбавители

5.1 Разбавители

Для подготовки, производства и проверки соответствия требованиям питательных сред см. ISO 11133.

5.2 Разбавители

Пользуются разбавителями, установленными в ISO 6887 для рассматриваемого продукта или конкретного международного стандарта, касающегося исследуемого продукта.

5.3 Агар для подсчета колоний (PCA)

5.3.1 Состав

Ферментативный перевар казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Глюкоза, безводная (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 г
Агар ^a	от 9 г до 18 г
Вода	1 000 мл

^a В зависимости от прочности геля – агара

При исследовании молочных продуктов добавляют 1,0 г снятого порошкового молока на литр питательной среды. Порошковое снятое молоко не должно содержать ингибиторных добавок.

5.3.2 Подготовка

Растворяют компоненты или обезвоженную полную среду в воде, если необходимо, при нагревании. Тщательно перемешивают и оставляют на несколько минут.

Регулируют pH (6.4), если необходимо, так чтобы после стерилизации pH составил $7,0 \pm 0,2$ при температуре 25 °C.

Распределяют среду по пробиркам, колбам или склянкам (6.8) подходящей вместимости. Стерилизуют в автоклаве(6.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин.

Если среда будет использоваться немедленно, охлаждают ее до температуры от 44 °C до 47 °C на водяной бане (6.3) перед использованием. Если не предполагается использовать среду сразу, ее хранят в темноте при температуре (5 ± 3) °C в течение не более 3 месяцев в таких условиях, чтобы не допустить изменений в составе и свойствах питательной среды.

Перед началом микробиологического исследования полностью расплавляют среду, затем охлаждают ее до температуры от 44 °C до 47 °C на водяной бане (6.3) и используют. См. ISO 11133.

Расплавленный агар стараются использовать сразу, так как его не следует оставлять более чем на 4 часа.

5.3.3 Оценочное испытание для обеспечения качества питательной среды

5.3.3.1 Общие положения

Агар для подсчета колоний является неселективной средой, используемой в данной части ISO 4833 для посева в чашках. Ее продуктивность должна проверяться в соответствии с ISO 11133.

5.3.3.2 Продуктивность

Инкубация	(30 ± 1) °C в течение (72 ± 3) ч
Контрольные штаммы	<i>Echerichia coli</i> WDCM 00013 или WDCM 00012 ^a [World data Centre for Microorganisms (WDCM)] <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i> WDCM 00003 <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 или WDCM 00034
Контрольная среда	Триптоновый соевый агар
Контрольный метод	Количественный
Критерий	Коэффициент продуктивности (PR) ≥ 0,7

^a Лаборатория пользователя должна использовать, как минимум, указанные штаммы. См. Ссылку [2] в отношении информации по номерам коллекционных штаммов культур и контактам.

5.4 Среда, используемая в качестве верхнего слоя (если необходимо, см. 9.2.7)

5.4.1 Состав

Агар ¹⁾	от 12 до 18 г
Вода	1 000 мл

^a В зависимости от прочности геля – агара

5.4.2 Приготовление

Добавляют агар в воду и нагревают до кипения при частом перемешивании, пока агар полностью не растворится, или пропаривают в течение 30 мин.

Регулируют pH (6.4), если необходимо, так чтобы после стерилизации pH составил $7,0 \pm 0,2$ при температуре 25 °C.

Распределяют среду по пробиркам, колбам или склянкам (6.8) подходящей вместимости.

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

Если среда будет использоваться немедленно, охлаждают ее до температуры от 44 °С до 47 °С на водяной бане (6.3) перед использованием. Если не предполагается использовать среду сразу, ее хранят в темноте при температуре (5 ± 3) °С в течение не более 3 месяцев в таких условиях, чтобы не допустить изменений в составе и свойствах питательной среды.

Перед началом микробиологического исследования полностью расплавляют среду, затем охлаждают ее до температуры от 44 °С до 47 °С на водяной бане (6.3) и используют. См. ISO 11133.

6 Аппаратура

Одноразовая аппаратура является приемлемой альтернативой многоразовой посуде, если отвечает соответствующим требованиям.

Обычное микробиологическое лабораторное оборудование (см. ISO 7218) и, в частности, следующее:

6.1 Устройство для сухой стерилизации (печь) или **влажной стерилизации** (автоклав), используемые в соответствии с ISO 7218.

6.2 Инкубатор (термостат), обеспечивающий работу при температуре 30 °С ± 1 °С.

6.3 Водяная баня, обеспечивающий работу при температуре от 44 °С до 47 °С.

6.4 рН-метр, точностью в пределах ± 0,1 рН при температуре 25 °С.

6.5 Чашки Петри, стеклянные или пластмассовые, диаметром от 90 мм до 100 мм.

6.6 Пипетки для полного слива, градуированные, номинальной вместимостью 1 мл, градуированные с ценой деления 0,1 мл, ISO 835^[1] класс А, или автоматические пипетки, ISO 8655-2^[2] с использованием стерильных наконечников.

6.7 Устройство для подсчета колоний (необязательно), включающее освещенное основание с и (необязательно) механический или электронный цифровой счетчик.

6.8 Испытательные пробирки, колбы или склянки, соответствующей вместимости и не больше 500 мл.

7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в данной части ISO 4833. Отбор проб может проводиться в соответствии с конкретным Международным стандартом на данный продукт. Если конкретного Международного стандарта на отбор проб данного продукта не существует, рекомендуется согласовывать метод отбора проб между заинтересованными сторонами.

Большое значение имеет поступление в лабораторию действительно репрезентативной пробы, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и хранения.

8 Приготовление пробы для анализа

Пробу для анализа готовят в соответствии с конкретным международным стандартом на данный продукт.

9 Проведение анализа

9.1 Проба для анализа, исходная суспензия и разведение

См. соответствующую часть ISO 6887 и конкретный международный стандарт на исследуемый продукт.

9.2 Посев и инкубация

9.2.1 Берут две стерильные чашки Петри (6.5). Переносят в каждую чашку с помощью стерильной пипетки (6.6) 1 мл испытуемой пробы, если она жидкая, или 1 мл исходной суспензии в случае других продуктов (разведение 1:10). Если подготовлены чашки для более чем одного разведения, их можно свести к одной чашке (ISO 7218).

9.2.2 Берут две другие стерильные чашки Петри (6.5). Переносят в каждую чашку с помощью другой стерильной пипетки (6.6) 1 мл разбавленной 10:1 испытуемой пробы (жидкий продукт), или 1 мл исходной суспензии, разбавленной 1:100 (другие продукты).

9.2.3 Если необходимо, повторяют процедуру с последующими разведениями, используя для каждого нового разбавления новую стерильную пипетку.

9.2.4 Если необходимо и возможно, выбирают только критические этапы разведения (не менее двух последовательных десятичных разведений) для инокуляции чашек Петри, чтобы получить от 10 до 300 колоний на чашку.

9.2.5 Заливают от 12 мл до 15 мл агара для подсчета колоний (5.3) при температуре 44 °C – 47 °C в каждую чашку Петри. Время, истекшее с момента завершения приготовления исходной суспензии (или разбавления 1:10, если продукт жидкий) и моментом, когда среду (5.3) разливают в чашки, не должно превышать 45 мин.

9.2.6 Тщательно перемешивают посевной материал со средой путем вращения чашки Петри и дают смеси застыть, оставив чашки Петри стоять на горизонтальной прохладной поверхности.

9.2.7 После полного затвердевания и только в случае, если имеются подозрения, что исследуемый продукт содержит микроорганизмы, колонии которых могут переполнить поверхность среды, заливают примерно 4 мл верхнего слоя среды (5.4) или агара для подсчета колоний (5.3) при температуре 44 °C – 47 °C на поверхность засеянной среды. Дают верхнему слою среды затвердеть, как описано в 9.2.6.

9.2.8 Переворачивают чашки Петри и помещают в инкубатор (6.2) при температуре 30 °C ± 1 °C в соответствии с ISO 7218 на 72 ч ± 3 ч.

9.3 Подсчет колоний

9.3.1 После установленного инкубационного периода (9.2.8) оставляют чашки, содержащие менее 300 колоний. Посчитывают колонии на чашках используя устройство для подсчета колоний (6.7), если необходимо. Чашки исследуют в приглушенном свете. Важно включить в счет точечные колонии, а также, чтобы оператор не подсчитал ошибочно нерастворенные частицы твердого материала в чашках, приняв их за точечные колонии. Сомнительные объекты исследуют тщательно, используя более сильное увеличение, там, где требуется, чтобы отличить колонии от постороннего материала.

9.3.2 Разбросанные колонии должны считаться как отдельные. Если менее четверти чашки занято чрезмерно разросшимися колониями, подсчет ведут на другой части чашки, и рассчитывают общее число колоний в чашке. Если разросшимися колониями занято более четверти чашки, такую чашку бракуют.

10 Обработка результатов

10.1 Метод вычисления

Следуют процедуре, установленной в ISO 7218.

10.2 Прецизионность

10.2.1 Общие положения

Показатели прецизионности были оценены для чашек, содержащих более 15 и менее 300 колоний. Показатели прецизионности зависят от ассоциации флоры и матрицы пробы. Представленные данные выведены из результатов совместной работы (см. ссылки [4] – [6]) и действительны для сырого и пастеризованного молока. Эти данные можно использовать как оценки при подсчете колоний в исследованиях других продуктов.

10.2.2 Повторяемость (сходимость)

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытания, полученными одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не должна быть выше предела повторяемости, $r = 0,25$ в десятичном логарифме $\log_{10}N$ микроорганизмов, где N — число микроорганизмов на миллилитр (соответствует 1,8 на нормальной шкале по количеству микроорганизмов на миллилитр).

ПРИМЕЧАНИЕ Такой предел повторяемости был выведен из результатов совместных исследований сырого и пастеризованного молока (см. ссылки [4] – [6]) и может быть использован для таких продуктов.

10.2.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытания, полученными одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях разными операторами на разном оборудовании не должна быть выше предела воспроизводимости, $R = 0,45$ в десятичном логарифме $\log_{10} \log_{10}N$ микроорганизмов, где N — число микроорганизмов на миллилитр (соответствует 2,8 на нормальной шкале по количеству микроорганизмов на миллилитр).

ПРИМЕЧАНИЕ Такой предел повторяемости был выведен из результатов совместных исследований сырого и пастеризованного молока (см. ссылки [4] – [6]) и может быть использован для таких продуктов.

10.3 Интерпретация результатов испытания

10.3.1 Общие положения

В следующих примерах (10.3.2 и 10.3.3) рассматриваются средние показатели прецизионности, уровень вероятности 95 % и анализ одной пробы. Следует отметить, что в практических условиях часто используют среднее от нескольких проб. Цифрами указано число микроорганизмов в миллилитре.

10.3.2 Условия повторяемости

Первый результат: $10^5 = 100\ 000$

Расхождение между первым и вторым результатом не должно превышать $0,25 \log_{10}N$.

Второй результат: Нижняя граница: $10^{4,75} = 56\ 000$

Верхняя граница: $10^{5,25} = 178\ 000$

Расхождение между первым и вторым результатом приемлемо, если второй результат не ниже 56 000 и не выше 178 000.

10.3.3 Условия воспроизводимости

Результаты, полученные в первой лаборатории (среднее от параллельных определений): $10^5 = 100\ 000$

Расхождение между первым и вторым результатом, полученным во второй лаборатории, не должно превышать $0,25 \log_{10}N$.

Второй результат: Нижняя граница: $10^{4,55} = 36\ 000$

Верхняя граница: $10^{5,45} = 280\ 000$

Расхождение между результатами, полученными первой и второй лабораторией приемлемы, если вторая лаборатория получает результат не ниже 36 000 и не выше 280 000.

В Приложении А показан расчет и использование критической разности (CD) для интерпретации результатов.