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

Часть 2.

**Метод подсчета колоний при
температуре 30 °C при посеве на
поверхность среды в чашках**

iTeh STANDARDS ITY (standards.itih.ai)

*Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration
of microorganisms.* [13](https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed)

[https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-](https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed)

3ed Part 2: Colony-count at 30 degrees C by the surface plating technique

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 4833-2:2013(R)

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 4833-2:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2013

Все права сохраняются. 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	2
3 Термины и определения	2
4 Сущность метода	2
5 Питательные среды и разбавители	3
5.1 Общие положения	3
5.2 Разбавители	3
5.3 Агар для подсчета колоний (PCA)	3
6 Аппаратура	4
7 Отбор проб	5
8 Приготовление пробы для анализа	5
9 Проведение анализа	5
9.1 Проба для анализа, исходная суспензия и разведения	5
9.2 Посев и инкубация	5
9.3 Подсчет колоний	6
10 Обработка результатов	6
11 Протокол испытания	6
Приложение А (информативное) Подсчет колоний, посеянных на поверхности агара в чашке с помощью устройства для спирального посева	8
Библиография	14

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 Directives, Part 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 Directives, Part 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 объявлениях 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 34, *Пищевые продукты*, Подкомитет SC 9, *Микробиология*.

Настоящее первое издание наряду с ISO 4833-1 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 среды в чашках*

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

Часть 2.

Метод подсчета колоний при температуре 30 °C при посеве на поверхность среды в чашках

1 Область применения

Настоящая часть ISO 4833 устанавливает горизонтальный метод подсчета микроорганизмов, которые растут и образуют колонии на поверхности твердой среды 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, содержащей чувствительные к нагреванию микроорганизмы, которые составляют значительную долю общей флоры (например, психотрофные организмы в охлажденных и замороженных пищевых продуктах, сушеных и других пищевых продуктах, которые могут содержать чувствительные к нагреванию микроорганизмы);
- 2) продукции, содержащей облигатно-аэробные бактерии, которые составляют значительную долю общей флоры (например, *Pseudomonas* spp.);
- 3) продукции, содержащей небольшие частицы, которые могут затруднить различение поверхностных колоний от колоний, посеянных заливкой;
- 4) продукции, интенсивный цвет которой мешает опознаванию колоний глубинного посева;
- 5) продукции, для которой различие между типами колоний требуется как часть оценки качества продукции.

В дополнение к способу посева распределения по поверхности среды вручную, данная часть ISO 4833 также устанавливает применение аппарата для спирального посева бактерий на чашки, ускоренный метод выполнения подсчета поверхностных колоний (Приложение А).

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 будут неэффективно обнаруживаться.

Для некоторых матриц метод, установленный в данной части ISO 4833, может давать результаты, отличающиеся от результатов, полученных методом, установленным в ISO 4833-1.

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, распределяют по поверхности плотной агаровой среды в чашках Петри.

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 Общие положения

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 в конкретном международном стандарте, касающемся исследуемого продукта.

5.3 Агар для подсчета колоний (РСА)

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

Распределяют среду по колбам или склянкам (6.9) 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 47 °C до 50 °C на водяной бане (6.4) перед использованием. Если не предполагается использовать среду сразу, дают ей застыть в колбе или склянке. Перед применением среду плавят полностью на кипящей водяной бане, затем охлаждают на водяной бане (6.4), поддерживаемой при температуре от 47 °C до 50 °C.

5.3.3 Подготовка агаровой среды в чашках

Заливают от 15 мл до 20 мл питательной среды в стерильные чашки Петри (6.6) и дают застыть.

Чашки можно хранить при температуре $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ в течение до 4 недель.

Непосредственно перед применением чашки с агаром следует подсушить в соответствии с ISO 11133.

5.3.4 Оценочное испытание для обеспечения качества питательной среды

5.3.4.1 Общие положения

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

5.3.4.2 Продуктивность

Инкубация	$(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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) $\geq 0,7$

^a Лаборатория пользователя должна использовать, как минимум, указанные штаммы. См. Ссылку [15] в отношении информации по номерам коллекционных штаммов культур и контактам.

6 Аппаратура

Одноразовая аппаратура является приемлемой альтернативой многоразовой стеклянной и пластмассовой 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 Сушильный шкаф или **инкубатор (термостат)**, вентилируемый конвекционным способом для сушки чашек со средой и обеспечивающий работу при температуре от 37°C до 55°C , или **шкаф с ламинарным потоком** воздуха.

- 6.3 Инкубатор (термостат)**, обеспечивающий работу при температуре $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$
- 6.4 Водяные бани**, одна обеспечивает работу при температуре от $47 ^\circ\text{C}$ до $50 ^\circ\text{C}$, и вторая – при температуре кипения воды.
- 6.5 pH-метр**, точностью в пределах $\pm 0,1$ единиц pH при температуре $25 ^\circ\text{C}$.
- 6.6 Чашки Петри**, стеклянные или пластмассовые, диаметром от 90 мм до 100 мм, или 140 мм.
- 6.7 Пипетки для полного слива, градуированные**, стерильные, номинальной вместимостью 0,1 мл и 1 мл, по ISO 835^[1] класс А, или автоматические пипетки по ISO 8655-2^[2] с использованием стерильных наконечников.
- 6.8 Устройство для подсчета колоний** (необязательно), включающее освещенное основание с и (необязательно) механический или электронный цифровой счетчик.
- 6.9 Колбы или склянки**, соответствующей вместимости для приготовления, стерилизации и, при необходимости, хранения питательной среды.
- 6.10 Спредер**, стеклянный, пластмассовый или стальной, стерильный, для распространения посевного материала по поверхности питательной среды.

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 рассматриваемый 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 рассматриваемый продукт.

9 Проведение анализа

9.1 Проба для анализа, исходная суспензия и разведения

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

9.2 Посев и инкубация

9.2.1 Стерильной пипеткой (6.7) переносят в центр каждой из двух чашек Петри с агаром 0,1 мл испытуемой пробы, если она жидкая, или 0,1 мл исходной суспензии в случае других продуктов. Если подготовлены чашки нескольких разведений, их можно свести к одной чашке (см. ISO 7218).

Если для определенных пищевых продуктов желательно подсчитать малые количества микроорганизмов, пределы обнаружения можно повысить десятикратно, засевая 1,0 мл пробы, если она жидкая или 1,0 мл исходной суспензии в случае других продуктов, либо на поверхность агара в большой чашке Петри (140 мм), либо на поверхность агара в трех мелких чашках (90 мм). В обоих случаях готовят вторую чашку для параллельного опыта, используя либо две большие чашки, либо шесть мелких.

9.2.2 Берут еще одну чашку Петри (5.3). Переносят в нее с помощью другой стерильной пипетки (6.7) 0,1 мл разбавленной 10^{-1} испытуемой пробы (жидкий продукт), или 0,1 мл исходной суспензии, разбавленной 10^{-2} (другие продукты).

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

9.2.4 Осторожно распределяют посевной материал по поверхности среды максимально быстро и равномерно, не касаясь боковых стенок чашки спредером (6.10). Можно пользоваться одним и тем же спредером для всех разбавлений, начиная с максимального разбавления и последовательно по увеличению концентрации посевного материала.

Чашки оставляют под крышками на примерно 15 мин при температуре окружающей среды, чтобы посевной материал абсорбировался в агаровую среду.

9.2.5 Переворачивают приготовленные чашки вверх дном и помещают их в инкубатор (6.3), установленный на температуру 30 °C в соответствии с ISO 7218. Инкубируют в течение (72 ± 3) ч.

ПРИМЕЧАНИЕ Пользуются устройством для спирального посева, см. Приложение А.

9.3 Подсчет колоний

9.3.1 После установленного инкубационного периода (9.2.3) оставляют чашки с агаром, содержащие, по возможности, менее 300 колоний. Подсчитывают все колонии на чашках, используя устройство для подсчета колоний (6.8), если необходимо. Важно включить в счет точечные колонии, а также, чтобы оператор не подсчитал ошибочно нерастворенные частицы твердого материала в чашках, приняв их за точечные колонии.

9.3.2 Разбросанные колонии должны считаться как отдельные. Если ожидается разрастание колоний, чашки исследуют спустя 24 ч или 48 ч и отмечают видимые колонии. 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. Если все чашки поражены разрастающимися колониями, подсчитывают наиболее подходящие и отмечают в протоколе испытания, что на результат могло оказать воздействие разрастание колоний.

10 Обработка результатов

Следуют процедуре, установленной в ISO 7218.

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать следующую информацию:

- a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- b) использованный метод отбора проб, если известен;