ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (EACC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARTIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ
(первая редакция)

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ

Методы микробиологического анализа

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Издание официальное

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации
202_

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 526 «Функциональные пищевые продукты»

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 202_ г. № ___)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от г. № межгосударственный стандарт ГОСТ введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным органам по стандартизации этих государств

Содержание

1 Область применения.....

2 Нормативные ссылки.....

3 Термины и определения.....

4 Требования безопасности.....

5 Оборудование, посуда, реактивы, питательные среды, сыворотки, штаммы.....

6 Условия проведения анализа .....

7 Подготовка к анализу.....

8 Проведение анализа.....

Приложение А (справочное) Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ .....

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ
Методы микробиологического анализа

Specialized food products. Method for microbiological analysis

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на специализированные пищевые продукты, в состав которых входят пробиотические микроорганизмы (молочные продукты, молочные составные продукты, молокосодержащие продукты, безалкогольные напитки и биологически активные добавки к пище) и устанавливает методы микробиологического анализа посторонних микроорганизмов.

Примечания

1. При необходимости для выявления и определения количества посторонних микроорганизмов в специализированных пищевых продуктах, содержащих пробиотические микроорганизмы, можно использовать другие методы, если они валидированы по ГОСТ ISO 16140 относительно методов, рекомендованных настоящим стандартом.

2. Настоящий стандарт допускается распространять на пищевые продукты при условии соблюдения диапазона измерений.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 171 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ 177 Водорода перекись. Технические условия

ГОСТ 490 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2156 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4165 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4170 Реактивы. Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4209 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4530 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5712 Реактивы. Аммоний щавелевокислый 1-водный. Технические условия

ГОСТ 5833 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6259 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6687.0 Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 6691 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9485 Реактивы. Железо (III) серно-кислое 9-водное. Технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.12 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 15113.0 Концентраты пищевые. Правила приемки, отбор и подготовка проб

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 18481 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 20730 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27068 Реактивы. Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) 5-водный. Технические условия

ГОСТ 28178 Дрожжи кормовые. Методы испытаний

ГОСТ 28495 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169 (ИСО 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29311 Гидролизаты панкреатические для бактериальных питательных сред. Общие технические условия

ГОСТ 30347 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*

ГОСТ 30712 Продукты безалкогольной промышленности. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 30726 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31659 (ISO 6579-1:2017) Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения, подсчета и серотипирования бактерий рода *Salmonella*. Часть 1. Обнаружение *Salmonella spp.*

ГОСТ 31708 (ISO 7251:2005) Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*. Метод наиболее вероятного числа

ГОСТ 31746 (ISO 6888-1:1999: ISO 6888-2:1999; ISO 6888-3:2003) Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазололожительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*

ГОСТ 31747 (ISO 4831:2006, ISO 4832:2006) Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 32011 (ISO 16654:2001) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения *Escherichia coli* 0157

ГОСТ 32031 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria spp.)*

ГОСТ 32159 Крахмал кукурузный. Общие технические условия

ГОСТ 32901 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 33629 Консервы молочные. Молоко сухое. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO 16140 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ГОСТ ISO 27205 Продукты кисломолочные. Бактериальные заквасочные культуры. Стандарт идентичности

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 10444.12, нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **биологически активные добавки к пище на основе пробиотических микроорганизмов**: Биологически активные добавки к пище, содержащие жизнеспособные пробиотические микроорганизмы, с добавлением или без добавления молочнокислых микроорганизмов, пищевых и(или) биологически активных веществ.

3.2 **бактерии группы кишечных палочек (колиформы)**: Грамотрицательные. неспорообразующие. аэробные и факультативно-анаэробные палочковидные микроорганизмы, ферментирующие лактозу с образованием газа при температуре (37±1)°С за 24-48 ч, относящиеся преимущественно к родам *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* и *Serratia*.

3.3 **презумптивные бактерии *Escherichia coli*:** Не утилизирующие цитраты грамотрицательные неспорообразующие палочковидные микроорганизмы, способные расти и ферментировать лактозу при температуре (44±1)°С, образующие и не образующие индол из триптофана.

3.4 **бактерии рода *Salmonella***: Грамотрицательные неспорообразующие аэробные и факультативно-анаэробные палочковидные преимущественно подвижные микроорганизмы, все представители рода которых патогенны для человека.

3.5 **коагулазоположительные стафилококки**: Грамположительные каталаза- и коагулазоположительные факультативно-анаэробные микроорганизмы сферической (кокковой) формы.

3.6 **бактерии *Staphylococcus aureus***: Вид коагулазоположительных стафилококков, как правило, пигментированных, образующих ацетоин и ферментирующие мальтозу в аэробных условиях, большая часть представителей которого способна продуцировать термостабильные энтеротоксины.

3.7 **бактерии *Listeria monocytogenes***: Грамположительные неспорообразующие факультативно-анаэробные палочковидные микроорганизмы, подвижные при 25°С и неподвижные при 37°С, обладающие бета-гемолитической и фосфолипазной активностью, все серотипы которых патогенны для человека.

3.8. **бактерии рода *Listeria* (*Listeria* spp.)**: Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии на плотных селективных средах и идентифицируемые по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам в соответствии с ГОСТ 32031.

В настоящем стандарте приведены следующие сокращения:

БАД – биологически активные добавки к пище;

БГКП – бактерии группы кишечных палочек;

ЖСА – желточно-солевой агар;

ЗПВ – забуференная пептонная вода;

МПА - мясопептонный агар;

МПБ - мясопептонный бульон;

МСА – молочно-солевой агар;

ПАЛ - питательный агар для выделения листерий;

ПБЛ - питательный бульон для выделения листерий;

ALOA - агар Listeria по Оттавиани и Агости;

BSA - висмут-сульфит агар;

LDC - L-лизин-декарбоксилазная среда (L-Lysine decarboxylation medium);

MKTTn-бульон - Мюллера-Кауфмана тетратионатно-новобиоциновый бульон;

MLCB - агар селективный с маннитом, лизином, кристалл-виолетом и бриллиантовым зеленым для выделения сальмонелл;

MSRV-агар - модифицированный полужидкий селективный агар Раппопорта-Василиадиса;

PBS - фосфатно-солевой буфер;

RVS-бульон - среда Раппопорта-Василиадиса с соей;

TSB - трипказо-соевый бульон;

TSI-агар - агар трехсахарный железистый;

TSYEA - триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом;

TSYEB - триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом;

UVM - селективный накопительный бульон;

VP - реакция Фогеса-Проскауэра;

XLD - ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

4 Требования безопасности

4.1. Условия безопасного проведения работ

4.1.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005;

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать гигиенических нормативов, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

4.1.2 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.018.

4.1.3 Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.1.4 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

4.1.5 Требования безопасности при работе в микробиологической лаборатории с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) по нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

4.1.6 Микробиологические исследования проводят с соблюдением требований ГОСТ ISO 7218.

4.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке результатов допускаются лица с высшим или средним специальным образованием с опытом работы в микробиологической лаборатории, освоившие методы и прошедшие инструктаж по технике безопасности при работе с вредными веществами и пожарной безопасности.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

5 Оборудование, посуда, реактивы, питательные среды, сыворотки, штаммы

pH-метр/иономер лабораторный с диапазоном измерения pH 0-14, с точностью измерения ±0,1 ед. pH при температуре от 20°С до 25°С.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,001; ±0,01 и ±0,1 г.

Аппарат для сухой стерилизации (стерилизационный сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав) по ГОСТ ISO 7218.

Бани водяные, поддерживающие температуру от 37°С до 50°С.

Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 0°С до 100°С.

Рекомендуется использовать водяные бани, содержащие антибактериальное средство для снижения риска инфицирования бактериями.

Термостаты, позволяющие поддерживать температуры от 25°С до 55°С с погрешностью измерения температуры не более ±1°С.

Холодильник, поддерживающий температуру (5±3)°С.

Морозильная камера, поддерживающая температуру минус (20±5)°С.

Термометр стеклянный жидкостной (нертутный), с диапазоном измерения температуры от 0°С до 100°С ценой деления шкалы 1°С по ГОСТ 28498.

Ареометр-сахарометр с диапазоном измерений 0-10 %, с ценой деления шкалы 0,1% и пределом допускаемой погрешности ±0,1% по ГОСТ 18481.

Спиртовка СЛ-1 или аналогичная по ГОСТ 25336.

Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание температуры (160±5)°С.

Стерильные бактериологические петли, диаметром около 3 мм (объем 10 мм^3), стерильные бактериологические петли, объемом 1 мм^3, и иглы или петли для пересева.

Часы или таймер.

Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа (стомахер) со стерильными полимерными пакетами однократного применения.

Аппарат для встряхивания жидкостей (шуттель-аппарат).

Микроскоп оптический лабораторный, обеспечивающий просмотр в проходящем свете, с увеличением 900-1000.

Стекла предметные и покровные.

Микроскоп для фазово-контрастной микроскопии.

Лупа с увеличением в 4-10 раз по ГОСТ 25706.

Холодильник, поддерживающий температуру (5±3)°С.

Морозильная камера, поддерживающая температуру минус (20±5)°С.

Пробки резиновые конусные.

Емкости металлические или кастрюли для растворения, расплавления, нагревания или охлаждения питательных сред.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Бумага пергаментная.

Бумага индикаторная универсальная для определения pH жидкостей (0 — 14) ед. pH.

Шпатели микробиологические Дригальского стеклянные.

Шпатели металлические лабораторные прямые.

Ложки из нержавеющей стали разной емкости.

Ножи из нержавеющей стали.

Ножницы из нержавеющей стали.

Консервные ножи цельнометаллические.

Пинцеты анатомические по ГОСТ 21241.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Бумага индикаторная универсальная для определения величины pH.

Стерильные градуированные пипетки или автоматические пипетки номинальной вместимостью 25 $см^3$, 10 $см^3$, 1 $см^3$ и 0,1 $см^3$.

Стерильные чашки Петри, диаметром 90 мм и (при необходимости) большего размера (диаметром 140 мм).

Чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов по ГОСТ 23932.

Пипетки 1-1(2)-1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1 (2)-1 (2)-1 (2, 5, 10) по ГОСТ 29227.

Дозаторы лабораторные (автоматические пипетки) с использованием стерильных наконечников необходимого объема с относительной погрешностью дозирования не более ± 1%.

Колбы мерные 2-50 (100, 200, 500, 1000)-2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические Кн-2-(50, 100, 250)-34 ТХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры 1 (2)-50(100)-1 по ГОСТ 1770.

Пробирки П1, П2-16-150 ТС по ГОСТ 25336.

Пробирки П1, П2-21-200 ТС по ГОСТ 25336.

Пробирки Дархама (поплавки стеклянные) с размерами, пригодными для использования в пробирках с размерами 16х160 мм.

Стаканчики для взвешивания (бюксы) типов СВ и СН по ГОСТ 25336.

Ступки лабораторные фарфоровые с пестиком по ГОСТ 9147.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Агар питательный сухой.

Агар Байрд-Паркера.

Агар солевой.

Агар сывороточный БФ.

Агар с дихлораном, бенгальским розовым и хлорамфениколом.

Бульон солевой.

1-Нафтол (альфа-нафтол) технический.

Бриллиантовый зеленый.

Бромтимоловый синий.

Бенгальский розовый.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода питьевая по нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Гидролизат казеина панкреатический ГОСТ 29311.

Гидролизат сои ферментативный.

Гидролизат животных и растительных тканей ферментативный.

Глицерин по ГОСТ 6259.

Дефибринированная кровь барана или кролика.

D-глюкоза по ГОСТ 6038, ч.

D-лактоза 1-водная.

D(+) мальтоза для микробиологических целей.

DL-триптофан.

Желчь сухая или желчь нативная сельскохозяйственных животных стерильная.

Аммоний щавелевокислый 1-водный по ГОСТ 5712.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Железо III сернокислое, 9 -водное по ГОСТ 9485.

Йод по ГОСТ 4159.

Калия гидроокись, раствор массовой концентрацией 10 г/дм^3 по ГОСТ 24363.

Калий йодистый по ГОСТ 4232, ч.д.а.

Калий фосфорнокислый одмозамещенный по ГОСТ 4198, ч.

Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493.

Кальций углекислый по ГОСТ 4530.

Кислота молочная, раствор объемной долей 20 % по ГОСТ 490.

Кислота соляная, раствор объемной долей 20% по ГОСТ 3118.

Кристаллический фиолетовый.

Лимонная кислота по ГОСТ 3652, х.ч. или ч.

Литий хлористый по ГОСТ 4328, ч., или х.ч., или ч.д.а.

Магний сернокислый 1- и 7-водный по ГОСТ 4523, х.ч.

Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209, ч.х.ч., или х.ч., или ч.д.а.

Малахитовый зеленый.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Натрия гидроокись, раствор массовой концентрацией 200 г/дм^3 по ГОСТ 4328.

Медь сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165, х.ч.

Молоко коровье обезжиренное стерильное.

Молоко коровье обезжиренное сухое по ГОСТ 33629.

Мочевина (карбамид) по ГОСТ 6691.

Бульон/агар мясо-пептонный по ГОСТ 20730.

Набор для окраски по Граму.

Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный по ГОСТ 4170, ч. или х.ч.

Натрий двууглекислый, раствор массовой концентрацией 100 г/дм^3 по ГОСТ 2156.

Натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280, ч.д.а.

Натрий серноватисто-кислый (натрия трисульфат) 5-водный по ГОСТ 27068.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, ч., или х.ч., или ч.д.а.

Натрий додецилсульфат (лаурилсульфат).

Тиосульфат натрия (гипосульфит).

Цинка сульфат 7-водный, х.ч.

Пара-диметиламинобензальдегид, ч.

2,3,5-трифенилтетраэолий хлористый, ч.д.а.

Экстракт дрожжевой.

Крахмал по ГОСТ 32159.

Эскулин, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Цитрат железа аммонийного.

Цитрат (III) железа.

D-маннит.

Неомицин сульфат, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Соль бензилпенициллина натриевая или калиевая, массовой долей основного вещества не менее 98%.

Ванкомицина гидрохлорид, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Сульфат стрептомицина или дигидрострептомицина сульфат или пантотенат, массовой долей основного вещества не менее 72 %.

Сульфаметазин.

Хлорамфеникол (левомицетиина сукцинат), массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Хлортетрациклина гидрохлорид, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Кислота налидиксовая.

Акрифлавина гидрохлорид.

Полимиксин В сульфат, массовой долей основного вещества не менее 6000 МЕ/мг.

Полимиксин Е (сульфат колистина), массовой долей основного вещества не менее 15000 МЕ/мг.

Пентагидрат цефтазидима натрия, массовой долей основного вещества не менее 86 %.

Раствор с объемной долей перекиси водорода 3% - по ГОСТ 10444.1.

Коммерческие наборы для окраски по Граму - согласно инструкции производителя.

Коммерческие наборы для биохимической ручной идентификации – согласно инструкции производителя.

Дихлоран (2,6-дихлор-4-нитроанилин).

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Плазма крови кролика цитратная сухая.

Сахароза по ГОСТ 5833.

Сафранин О или Т.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья по ГОСТ 5962.

Агар трехсахарный железистый с мочевиной (TSI-агар с мочевиной).

Среда Эндо сухая.

Среда Клиглера сухая.

ГРМ-агар и ГРМ бульон триптозный.

Забуференная пептонная вода (ЗПВ) сухая.

Агар/бульон триптон-соевый с дрожжевым экстрактом (TSYEA / TSYEB) сухой.

Агар/бульон Трипказо-соевый (TSA/TSB) сухой.

Агар/бульон Мясопептонный (МПА/МПБ) сухой.

Среда Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) сухая.

Модифицированный полужидкий селективный агар Раппопорта-Василиадиса (MSRV).

Селенитовая среда накопления (среда Лейфсона).

Мюллера-Кауфмана тетратионатно-новобиоциновый бульон (МКТТn-бульон) сухой.

Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) сухой.

Трехсахарный агар с железом (TSI-агар) сухой.

Агар с мочевиной (Кристенсена) сухой.

L-лизин-декарбоксилазная среда (LDC, L-Lysine decarboxylation medium).

Среда и реактив для индольной реакции (дополнительно по ГОСТ 31659).

Бульон Фразера полуконцентрированный (Half Fraser broth) и Бульон Фразера (Fraser broth).

Селективный накопительный бульон (UVM) и селективный накопительный бульон (UVM II) сухой.

Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I) и ПБЛ II сухой.

Агар Listeria по Оттавиани и Агости (ALOA) сухой.

Оксфорд агар (Oxford agar) сухой.

Палкам агар (PALCAM agar) сухой.

Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ) сухой.

Бриллианс Listeria агар (BRILLIANCE LISTERIA agar) сухой.

Среда Левина сухая.

Среда Плоскирева сухая.

Агар селективный с маннитом, лизином, кристалл-виолетом и бриллиантовым зеленым для выделения сальмонелл (MLCB).

Среда Кесслер сухая.

Сухие агглютинирующие адсорбированные поливалентные сальмонеллезные О-сыворотки против соматических антигенов (основных А, В, С, D, Е групп и редких групп), против Vi- и Н-антигенов.

Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью.

Бульон селективный с лаурилсульфатом сухой.

ЕС-бульон с лаурилсульфатом сухой.

Бульон Жиолитти-Кантони модифицированный.

Сусло солодовое неохмеленное.

Среда Сабуро сухая.

Феноловый красный.

Фенолфталеин, ч.д.а.

Фуксин основной.

Уголь активированный.

Экстракт мясной.

Яйца куриные пищевые по ГОСТ 31654.

Дрожжи хлебопекарные (прессованные) по ГОСТ 171.

Тест-штаммы (контрольные) микроорганизмов, типичные по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам для вида, паспортизированные и депонированные:

Listeria monocytogenes;

Escherichia coli;

Staphylococcus aureus;

Salmonella typhimurium & enteritidis;

Rhodococcus equi;

Listeria innocua;

Listeria ivanovii;

Enterococcus faecalis.

В качестве контрольных штаммов используют референсные тест-штаммы в соответствии с номерами WDCM (Всемирный центр данных по микроорганизмам, "www.wfcc.info"), или контрольные эталонные штаммы из национальных коллекций микробных культур, или другие штаммы в соответствии с ГОСТ ISO 11133. Для некоторых национальных ограничений и указаний может потребоваться использование другого серовара *Salmonella*. Необходимо ссылаться на национальные требования, касающиеся выбора сероваров *Salmonella.*

Штаммы необходимо сохранять в лиофильно высушенном виде. При частом использовании допускается сохранять в полужидком агаре для бруцелл в пробирках с плотно притертыми пробками, в защищенном от света месте, при температуре (5 ± 1)°С с регулярным пересевом.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов, материалов, питательных средств и диагностических препаратов аналогического назначения по качеству не ниже вышеуказанных.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

6 Условия проведения анализов

При подготовке и выполнении анализов в лаборатории соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — (20 ± 5)°С;

- относительная влажность воздуха — не более 80 %.

7 Подготовка к анализу

7.1 Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 31904, ГОСТ 26669, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 32901 с учетом следующих положений.

7.1.1 Отбор проб пробиотических пищевых продуктов для микробиологических анализов проводят перед отбором проб для физико-химических и органолептических анализов.

Анализируют пробы, отобранные из транспортной или потребительской упаковки с продукцией, попавшей в выборку. Объем выборки установлен требованиями ГОСТ 32901, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 15113.0, ГОСТ 6687.0. ГОСТ 28495.

При контроле продукции в потребительской упаковке из партии продукции отбирают соответствующее количество единиц потребительской упаковки для приготовления точечных проб по 7.1.3.

Пробу для анализа отбирают по ГОСТ 31904 взвешиванием (для твердых и сухих продуктов) или измерением объема (для жидких продуктов). Отбор проб проводят в стерильную посуду достаточной вместимости и подходящей формы (стеклянные колбы, банки, чашки Петри), закрывают стерильными пробками или крышками, горловины колб и банок закрывают стерильной бумагой и обвязывают.

Допускается использовать для отбора проб одноразовые асептические контейнеры с крышками.

7.1.2 Жидкие и сыпучие порошкообразные пробиотические продукты перемешивают до вскрытия упаковки пятикратным переворачиванием. Перед вскрытием поверхность упаковки продукта протирается для удаления грязи, при необходимости обмывается питьевой водой и подсушивается. Затем поверхность упаковки протирается 70 %-ным этиловым спиртом.

После высыхания поверхности производится вскрытие упаковки в асептических условиях стерильными или профламбированными инструментами. Продукт во вскрытых упаковках вновь тщательно перемешивается.

7.1.3 Из отобранной суммарной пробы готовят лабораторную пробу — определенное количество или определенный объем продукта, достаточное по размеру для приготовления проб для анализа, необходимых для анализа предполагаемого или допускаемого количества посторонних микроорганизмов, указанных в документе на анализируемый продукт (для высева в питательные среды и приготовления разведений).

При этом масса средней пробы для пробиотических продуктов на молочной и молокосодержащей основе твердых, сыпучих и пастообразных должна быть не менее 100 г, для жидких — не менее 100 $см^3$. Для прочих специализированных продуктов,

обогащенных пробиотическими микроорганизмами, — не менее 150 г ($см^3$), для БАД на основе пробиотических микроорганизмов сухих — не менее 70 г ($см^3$), жидких — не менее 100 $см^3$.

Масса или объем пробы, предназначенной для приготовления первого (исходного) разведения продукта или БАД, должна составлять 10 г или 10 $см^3$ продукта, для посева в питательные среды — соответствовать нормируемой величине для определяемого микроорганизма.

Примечание — Например, при анализе БГКП в сухих БАД на основе пробиотических микроорганизмов размер точечной пробы для посева в питательную среду должен составлять 2 г. БАД жидких на основе чистых культур микроорганизмов неконцентрированных — 10 $см^3$.

7.1.4 В случае многокомпонентного состава пробу продукта отбирают так, чтобы в ней были представлены все его компоненты в том же соотношении, что в анализируемой пробе.

7.1.5 Жидкие кисломолочные и сквашенные пробиотические продукты на молокосодержащей основе, жидкие БАД с пробиотическими микроорганизмами и прочие пробиотические ферментированные продукты и ингредиенты, перед проведением анализа нейтрализуют для предотвращения резкого снижения pH (на 0,5 ед. pH и более) питательных сред. Из каждой пробы после тщательного перемешивания стерильной пипеткой или стеклянной палочкой отбирают необходимый объем продукта, помещают в стерильную посуду и затем на каждые 10 $см^3$ анализируемого продукта добавляют около 1,0 $см^3$ стерильного раствора двууглекислого натрия (гидрокарбоната) с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$; содержимое перемешивают с использованием стерильных приспособлений или шуттель-аппарата.

Добавляют раствор гидрокарбоната, проверяя pH смеси с помощью индикаторной бумаги и доводя активную кислотность до (7,0 ± 0,2) ед. pH.

Допускается проводить нейтрализацию после внесения продукта или его разведений в питательные среды с помощью стерильного раствора гидроокиси натрия, приготовленного по ГОСТ 10444.1.

Добавляют раствор гидроокиси натрия, проверяя pH смеси с помощью индикаторной бумаги и доводя активную кислотность до (7,0 ± 0,2) ед. pH.

7.1.6 Нейтрализацию сухих кисломолочных и сквашенных пробиотических продуктов на молокосодержащей основе, БАД на основе пробиотических микроорганизмов, высушенных в среде культивирования, в том числе таблетированных и инкапсулированных, ингредиентов сухих, содержащих пробиотические микроорганизмы,

например, лиофилизированной биомассы пробиотических микроорганизмов, проводят на этапе приготовления разведений для посева или на этапе посева в среды для предварительного обогащения после внесения в них продукта или его разведений аналогично 7.1.5.

7.1.7 Творог, сыр, продукты творожные и другие аналогичные по консистенции пастообразные пробиотические продукты взвешивают на стерильном часовом стекле, чашке Петри, в бюксе, переносят в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую крышкой от чашки Петри, или пакет для перистальтического гомогенизатора, тщательно растирают, нейтрализуют по 7.1.5.

7.1.8 Пробы мороженого, обогащенного пробиотическими микроорганизмами, помещают в стерильную посуду с притертой или ватной пробкой. Перед использованием посуду с пробой нагревают на водяной бане при температуре не выше 40-45°С и перемешивают до получения однородной эмульсии.

При необходимости расплавленную пробу нейтрализуют по 7.1.5.

7.1.9 Микробиологические анализы скоропортящихся пробиотических продуктов проводят не позднее чем через 4 ч с момента отбора проб.

Пробы скоропортящихся пробиотических продуктов следует хранить и транспортировать до начала анализа в условиях, обеспечивающих температуру продуктов не выше (4 ± 2)°С, не допуская подмораживания.

Пробы замороженных пробиотических продуктов хранят и транспортируют при минусовых температурах в соответствии с условиями хранения конкретного продукта.

Пробы сухих пробиотических продуктов следует хранить и транспортировать до начала анализа в условиях температуры и относительной влажности, в соответствии с условиями хранения конкретного продукта.

7.2 Подготовка посуды и материалов

Всю новую посуду, предназначенную для бактериологических работ, кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты объемной долей 1 % — 2 %) в течение 15 мин, затем ополаскивают дистиллированной водой. Посуда с питательными средами после учета роста на них БГКП, *E. coli, Salmonella, S. aureus*, дрожжей, плесневых грибов. *Listeria* обеззараживается перед мойкой путем стерилизации в автоклаве по режимам, установленным для соответствующих групп микроорганизмов в нормативных правовых актах, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при (160 ± 5)°С в течение 2 ч или в автоклаве при (121 ± 1)°С в течение (30 ± 1) мин с последующим подсушиванием в сушильном шкафу.

Чашки Петри, пипетки и т. п. стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах. В верхнюю часть пипетки предварительно вкладывают кусочек ваты.

Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновыми обхватами.

Каучуковые, корковые и стеклянные пробки стерилизуют отдельно в автоклаве завернутыми в бумагу.

Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками. Срок хранения стерильной посуды — не более 30 сут при ненарушенной завертке или невскрытых пеналах.

Допускается использование одноразовой стерильной пластиковой посуды при соблюдении сроков годности, указанных на упаковке.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

7.3 Приготовление растворов реактивов и питательных сред

Для приготовления растворов и питательных сред используют дистиллированную воду.

7.3.1 Стерильная дистиллированная вода

Дистиллированную воду разливают в колбы или пробирки в необходимых количествах и стерилизуют в течение (20 ±1) мин при (121 ± 1)°С.

7.3.2 Приготовление раствора двууглекислого натрия для нейтрализации проб

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$ помещают (10,0 ± 0,1) г двууглекислого натрия, добавляют небольшое количество дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор разливают по 10-20 $см^3$ в пробирки и стерилизуют при температуре (121 ±1)°С в течение (15 ± 1) мин.

7.3.3 Приготовление раствора соляной кислоты объемной долей 20 %

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ наливают до половины дистиллированную воду, потом осторожно добавляют 20 $см^3$ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,19 $г/см^3$ по ГОСТ 3118. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

При необходимости полученный раствор разводят, доводя до нужной концентрации по объему.

7.3.4 Приготовление изотонического раствора хлористого натрия

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ помещают (8,5 ± 0,1) г хлористого натрия. Добавляют дистиллированную воду и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор разливают по 10 $см^3$ в пробирки, по 90 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости и стерилизуют при температуре (121 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин.

7.3.5 Приготовление концентрированного раствора фосфатного буфера

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ наливают 500 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют (34,0 ± 0,1) г однозамещенного фосфорнокислого калия и тщательно перемешивают. Устанавливают активную кислотность раствора (7,2 ± 0,1) ед. pH добавлением раствора гидроокиси натрия и доводят дистиллированной водой до метки.

Стерилизуют раствор при температуре (121 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин.

7.3.6 Приготовление разбавленного раствора фосфатного буфера

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ помещают 1,25 $см^3$ концентрированного раствора фосфатного буфера, добавляют дистиллированную воду и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор разливают по 10 $см^3$ в пробирки, по 90 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости, стерилизуют при температуре (121 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин и используют для приготовления разведений.

7.3.7 Приготовление раствора лимоннокислого натрия

Растворяют (20,0 ± 0,1) г трехзамещенного лимоннокислого натрия в 1 $дм^3$ дистиллированной воды, разливают в пробирки по 10 $см^3$ или в колбы по 90 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 2)°С в течение (15 ± 1) мин.

Раствор используют для разведения специализированных продуктов на основе творога, творожных продуктов, сыра.

7.3.8 Приготовление забуфронной пептонной воды

Забуференную пептонную воду для предварительного неселективного обогащения бактерий рода *Salmonella*, коагулазоположительных стафилококков готовят согласно ГОСТ 31659. Разливают в необходимом количестве в пробирки, флаконы или колбы соответствующей вместимости для обеспечения соотношения засеваемого продукта и среды 1:9, например, при посеве 25 г продукта — по 225 $см^3$, 2 г продукта — 18 $см^3$.

7.3.9 Приготовление растворов и реактивов для окраски по Граму осуществляют по ГОСТ 10444.1.

7.3.10 Для удаления закрепленных основных красящих растворов используют этиловый спирт (при окраске спиртовым раствором кристаллического фиолетового) и ацетон (при окраске водным раствором кристаллического фиолетового).

7.3.11 Приготовление питательных сред

Среды сухие промышленного изготовления, в том числе общего назначения, предназначенные для культивирования бактерий с целью изучения их свойств, готовят согласно прописям, указанным на этикетках. Если питательные среды или реактивы готовятся из сухих сред/реактивов или если используются готовые среды/реактивы, следуют инструкциям производителя относительно приготовления, условий хранения, срока годности и использования.

Допускается применение питательных сред (реактивов) аналогичного назначения, зарегистрированных и разрешенных к применению на территории государств, принявших стандарт, обеспечивающих соответствующую ГОСТ ISO 11133 специфическую активность (показатели чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов), дифференцирующие и ингибирующие свойства.

Допускается применение сред лабораторного приготовления из отдельных компонентов. Проверку качества подготовки, изготовления и оценки эффективности питательных сред для выращивания бактерий осуществляют по ГОСТ ISO 11133.

7.3.12 Определение pH питательных сред

Ориентировочное определение pH питательных сред допускается проводить с помощью индикаторных бумажных полосок для определения величины pH. Определение активной кислотности (pH) питательных сред проводят в использованием pH-метра по прилагаемым инструкциям к соответствующим приборам.

Устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял требуемую величину при температуре 25°С. При необходимости корректируют pH питательной среды, устанавливая ее в небольшом объеме путем добавления по каплям растворов гидроокиси натрия или соляной кислоты.

Допускается для подкисления сред использовать 20 %-ный раствор молочной кислоты.

Исходя из количества раствора, пошедшего на установление pH в данном объеме, вычисляют, какой объем раствора следует прибавить ко всему объему среды для достижения требуемой величины pH. После прибавления раствора и тщательного перемешивания снова проверяют pH среды.

7.3.13 Питательные среды и растворы реактивов для выявления БГКП и *Escherichia coli*

7.3.13.1 Среда Кесслер (с лактозой)

Жидкую селективную обогатительную среду Кесслер готовят по ГОСТ 31747. Дополнительно в случае использования среды нормальной концентрации для посева образцов пробиотических продуктов на молочной основе, масса (объем) которых превышает 1 г ($см^3$), разливают среду в колбы или флаконы соответствующей вместимости, содержащие пробирки Дархама (поплавки), по 50 $см^3$; в случае использования среды двойной концентрации для посева образцов других пробиотических продуктов. масса (объем) которых превышает 10 г($см^3$), разливают среду в колбы или флаконы соответствующей вместимости, содержащие пробирки Дархама (поплавки), по 100 $см^3$.

7.3.13.2 Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью

Жидкую селективную обогатительную среду бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью готовят по ГОСТ 31747. Дополнительно в случае использования среды двойной концентрации для посева образцов, масса (объем) которых превышает 10 г($см^3$). допускается разливать среду в колбы или флаконы соответствующей вместимости, содержащие пробирки Дархама (поплавки), по 100 $см^3$.

7.3.13.3 Бульон селективный с лаурилсульфатом (натрия додецилсульфатом)

К 1,0 $дм^3$ водопроводной воды добавляют 20 г триптозы (ферментативного перевара казеина и животных белков), 5 г лактозы, по 2,75 г калия гидрофосфата и дигидрофосфата. 5 г хлористого натрия. 0,1 г натрия додецилсульфата (лаурил сульфата), растворяют, нагревая на водяной бане при помешивании 2 -3 мин. При необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, после чего доводят объем водой до 1 $дм^3$. Устанавливают pH (6.8 ± 0,2) ед. при 25°С. При необходимости приготовления среды двойной концентрации количество всех ингредиентов, кроме воды, удваивают.

Разливают по 10 $см^3$ в пробирки размером 16 х 160 мм, содержащие пробирки Дархама (в случае использования среды нормальной концентрации), или в пробирки размером 20 х 200 мм или колбочки вместимостью 50 $см^3$, содержащие пробирки Дархама (поплавки) (в случае использования среды двойной концентрации).

Стерилизуют среду в автоклаве при температуре (121 ± 1)°С в течение 10 мин. Пробирки Дархама не должны содержать воздушные пузырьки после стерилизации.

7.3.13.4 Сухие среды бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью, среду Кесслер, бульон селективный с лаурилсульфататом, ЕС-бульон промышленного производства подготавливают для посева согласно прописи на этикетке.

7.3.13.5 Среды сухие Левина, Эндо

Среды Левина (эозин-метиленовоголубой агар), Эндо промышленного выпуска готовят согласно прописи, указанной на этикетке банок.

Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить при температуре (4 ± 2)°С до 10 сут.

Примечание — Среды могут использоваться также для пересева бактерия рода *Salmonella*.

7.3.13.6 Среда на индол (триптон/триптофановая среда)

В 1,0 дм^3 дистиллированной воды растворяют 10 г ферментативного перевара казеина (триптона), 5 г хлористого натрия, 1 г DL-триптофана. Доводят pH до (7,0 ± 0,1) ед. при 25°С, разливают в пробирки по 5,0 см^3, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при температуре (121 ± 1)°С.

Примечание — Среда может использоваться также для определения образования индола бактериями рода *Salmonella*.

7.3.13.7 Среда Кларка с глюкозой (VP-среда)

Взвешивают 7 г пептона, 5 г глюкозы, 5 г двузамещенного фосфорнокислого калия. Растворяют ингредиенты в 950,0 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH (6,9 ± 0,2) ед. при 25°С.

При необходимости фильтруют и доводят общий объем до 1,0 дм^3 дистиллированной водой. Разливают в пробирки по 3,0-5,0 см^3, стерилизуют в течение (20 ± 1) мин при (115 ± 1)°С.

Примечание — Среда может использоваться также для определения образования ацетоина бактериями рода *Salmonella*.

7.3.13.8 90 %-ный раствор этилового спирта

В колбу по ГОСТ 1770 емкостью 1000 см^3 к 900,0 см^3 96 %-ного этилового спирта добавляют 60,0 см^3 дистиллированной воды.

7.3.13.9 Раствор индикатора метилового красного

0,1 г индикатора метилового красного помещают в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 500 см^3, растворяют в 300,0 см^3 90 %-ного раствора этилового спирта, доливают до 500,0 см^3 дистиллированной водой.

Хранят раствор в колбе с притертой пробкой при температуре (4 ± 2) °С.

7.3.13.10 0,5 %-ный раствор бромтимолового синего в спирте

Взвешивают 0,5 г бромтимолового синего, помещают в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3, и доводят этиловым спиртом до метки.

Раствор хранят при температуре (4 ± 2)°С течение 30-35 сут в колбе с притертой пробкой.

7.3.13.11 0,5 %-ный и 0,1 %-ный растворы бриллиантового зеленого

Для приготовления 0,5 %-ного раствора асептически взвешивают 0,5 г индикатора бриллиантового зеленого, вносят в стерильную мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3 и доводят стерильной дистиллированной водой до метки.

Для приготовления 0,1 %-ного раствора в стерильный мерный цилиндр или колбу по ГОСТ 1770 к 10,0 см^3 исходного 0,5 %-ного раствора индикатора добавляют 40,0 см^3 стерильной дистиллированной воды.

Растворы хранят в холодильнике в течение 7-10 сут.

7.3.13.12 1,6 %-ный раствор бромкрезолового пурпурного в спирте

Взвешивают 1,6 г индикатора бромкрезолового пурпурного и количественно переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770, вместимостью 100 см^3. Доводят 96 %-ным этиловым спиртом до метки.

При необходимости фильтруют через бумажный фильтр.

Хранят в колбе со шлифом в условиях холодильника.

7.3.13.13 5 %-ный спиртовый раствор 1-Нафтола (альфа-нафтола)

Взвешивают 5 г альфа-нафтола, растворяют в 100,0 см^3 96 %-ного этилового спирта.

Раствор готовят непосредственно перед применением.

Примечание — Реактив может использоваться также для определения образования ацетоина бактериями рода *Salmonella*.

7.3.13.14 40 %-ный раствор гидроокиси калия

В стакане, вместимостью 100 см^3 взвешивают 40 г гидроокиси калия, переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3, растворяют в 60,0 см^3 дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят при температуре 4 -6°С.

7.3.13.15 1 %-ный водный раствор кристаллического фиолетового

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3 помещают 1 г кристаллического фиолетового, предварительно растертого в фарфоровой ступке с небольшим количеством дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят при температуре 4 -6°С.

7.3.13.16 Реактив на индол (Эрлиха)

Взвешивают 5 г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 $см^3$, помещают в коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ по ГОСТ 25336 и растворяют в 50,0 $см^3$ этилового спирта. С помощью мерного цилиндра, вместимостью 100 $см^3$, медленно добавляют 50,0 $см^3$ концентрированной соляной кислоты (плотность 1,18— 1,19 $г/см^3$).

Раствор хранят в колбе с притертой пробкой при температуре 4 -6°С.

Примечание — Реактив может использоваться также для определения образования индола бактериями рода *Salmonella.*

7.3.13.17 Среда Козера

Взвешивают 1,5 г фосфорнокислого натрия-аммония, 1 г фосфорнокислого двузамещенного калия, 0,2 г сульфата магния, 3 г лимоннокислого трехзамещенного натрия. Растворяют в 950,0 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 10,0 $см^3$ 0,5%-ного спиртового раствора бромтимолового синего. Устанавливают pH (6,8 ± 0,1) ед. при 25°С. Доводят объем дистиллированной водой до 1,0 $дм^3$.

Разливают по 10,0 $см^3$ в пробирки, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при (121 ± 1)°С.

7.3.13.18 Среда Симмонса

Среду готовят аналогично среде Козера (см. 7.3.13.15), но после измерения pH в нее добавляют 2 г агара на 1000 $см^3$, прогревают на водяной бане до расплавления агара, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при (121 ± 1)°С.

Разливают в стерильные чашки Петри или пробирки.

7.3.14 Питательные среды, растворы реактивов и диагностические сыворотки для выявления бактерий рода *Salmonella*

7.3.14.1 Среду Раппапорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон) — основную среду для селективного обогащения сальмонелл готовят по ГОСТ 31659.

Среду RVS-бульон сухую промышленного изготовления готовят согласно прописи на этикетке.

7.3.14.2. Модифицированный полужидкий селективный агар Раппопорта-Василиадиса (MSRV) готовят по ГОСТ 31659.

7.3.14.3 Селенитовую среду накопления Лейфсона — дополнительную среду для селективного обогащения сальмонелл готовят по ГОСТ 31659.

Дегидратированную селенитовую среду промышленного производства приготавливают согласно прописи на этикетке.

7.3.14.4 Бульон Мюллера-Кауфмана тетратионатно-новобиоциновый бульон (МКТТn-бульон) — дополнительную среду для селективного обогащения сальмонелл готовят по ГОСТ 31659.

7.3.14.5 Дифференциально-диагностические среды для выделения сальмонелл:

- ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар (XLD-агар) и бриллиантовый зеленый агар готовят по ГОСТ 31659;

- среды Плоскирева и висмут-сульфитный агар промышленного производства готовят согласно прописи, указанной на этикетке банки.

Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить и холодильнике до 10 сут.

7.3.14.6. Трехсахарный агар с железом (TSI-агар)

Взвешивают 3 г мясного экстракта, 3 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона, 5 г хлористого натрия, 10 г лактозы, 10 г сахарозы, 1 г глюкозы, 0,3 г цитрата (III) железа, 0,3 г тиосульфата натрия, 0,024 г фенолонового красного, 9-18 г агара. Растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, нагревая ее при частом перемешивании. Устанавливают pH (7,4 ± 0,2) ед. при 25°С.

Разливают по 10,0 $см^3$ в пробирки, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при (121 ± 1)°С.

Пробирки со средой после стерилизации оставляют в наклонном положении так, чтобы высота столбика среды была не менее 2,5-5 см, а скошенная поверхность над ним — 5 см.

Разлитые пробирки хранят, не допуская пересыхания, при температуре (5±1)°С не более четырех недель.

Примечания

1 Допускается использовать готовую сухую среду.

2 В качестве альтернативы можно использовать двухсахарный агар с железом (Клиглер-Хайна).

7.3.14.7. Агар с мочевиной (Кристенсена)

Взвешивают для основы 1 г пептона, 1 г глюкозы, 5 г хлористого натрия, 2 г фосфорнокислого калия однозамещенного, 0,012 г фенолового красного, 9-18 г агара. Растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, нагревая ее при частом перемешивании. Устанавливают pH (6,8 ± 0,2) ед. при 25°С.

Разливают в пробирки или флаконы, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при (121 ± 1)°С.

Основа среды может храниться в закрытых пробирках или колбах при температуре (5±1)°С не более трех месяцев.

Взвешивают для раствора мочевины 400 г мочевины. Растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды. Раствор стерилизуют фильтрацией через фильтр с размером пор 0,22 мкм (см. ГОСТ ISO 11133.).

В асептических условиях прибавляют 50 $см^3$ раствора мочевины к 950 $см^3$ основы среды, предварительно расплавленной и охлажденной до температуры от 47°С до 50°С. Готовую среду разливают по 10 $см^3$ в стерильные пробирки.

Пробирки со средой оставляют в наклонном положении

Разлитые пробирки хранят, не допуская пересыхания, при температуре (5±1)°С не более четырех недель.

Примечание - Допускается использовать готовую сухую среду.

7.3.14.8 0,4 %-ный водный раствор фенолового красного

Взвешивают 0,1 г индикатора фенолового красного, вносят в колбу вместимостью 50 $см^3$ по ГОСТ 1770 и вливают 25,0 $см^3$ дистиллированной воды. Тщательно перемешивают до полного растворения.

Раствор хранят в холодильнике до 7 сут.

7.3.14.9 Среда Клиглера из сухих питательных сред с мочевиной

Среду готовят и стерилизуют как указано в ГОСТ 28178. Пробирки со средой после стерилизации оставляют в наклонном положении так, чтобы высота столбика среды была не менее 3 см, а скошенная поверхность над ним — 5 см.

7.3.14.10 Сальмонеллезные агглютинирующие адсорбированные О-. Vi-. Н-сыворотки

Необходимые разведения сыворотки готовят перед использованием согласно прилагаемым инструкциям изготовителя.

7.3.15 Питательные среды, растворы реактивов, эмульсии и дефибринированная кровь для выявления коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus*

7.3.15.1 Солевой бульон

Жидкую селективную питательную среду солевой бульон для анализа специализированных пищевых продуктов на молочной основе готовят по ГОСТ 30347, для других продуктов — по ГОСТ 31746.

7.3.15.2 Модифицированный бульон Жиолитти-Кантони

Жидкую селективную питательную среду модифицированный бульон Жиолитти-Кантони готовят по ГОСТ 31746.

7.3.15.3 Агар Байрд-Паркера

Дифференциально-диагностическую агаризованную среду Байрд-Паркера и используемые для ее приготовления 1 %-ный раствор теллурита калия, 0,2 %-ный раствор сульфаметазина в 1 М растворе гидроксида натрия готовят по ГОСТ 31746.

Дегидратированный агар Байрд-Паркера промышленного производства готовят согласно прописи на этикетке.

7.3.15.4 Желточно-солевой агар

Дифференциально-диагностическую среду ЖСА готовят по ГОСТ 30347.

7.3.15.5 Молочно-солевой агар

Дифференциально-диагностическую среду МСА готовят по ГОСТ 30347.

7.3.15.6 Эмульсия яичного желтка

Эмульсию яичного желтка из свежих куриных яиц готовят по ГОСТ 31746.

Допускается использование готовой эмульсии яичного желтка промышленного производства, в этом случае эмульсию применяют в соответствии с инструкцией изготовителя.

7.3.15.7 Плазма крови кролика

Раствор плазмы крови кролика для определения способности выделенных культур коагулировать плазму крови готовят непосредственно перед использованием из плазмы крови кролика цитратной сухой в соответствии с инструкцией изготовителя.

Допускается использование плазмы из свежеполученной в асептических условиях крови из сердца кролика. В этом случае ее приготовление к использованию проводят по ГОСТ 31746.

7.3.15.8 Дефибринированная кровь животных

Для определения гемолитической активности выделенных культур используют стерильную дефибринированную кровь баранов, крупного рогатого скота, кроликов.

Допускается использование свежевзятой крови лабораторных животных (кроликов, морских свинок), дефибринированной по ГОСТ 31746.

7.3.16 **Питательные среды и растворы реактивов для определения количества плесневых грибов и дрожжей**

7.3.16.1 Раствор солодового сусла с массовой долей сухих веществ (7,5 ± 0,5) %

Сусло фильтруют через фильтрованную бумагу, разливают в колбы и стерилизуют (30 ± 1) мин в автоклаве при (108 ± 2)°С. Затем сусло декантируют. В прозрачном сусле определяют массовую долю сухих веществ ареометром-сахарометром, принимая каждые пять делений равными 1 % сухих веществ, и разбавляют водой до массовой доли сухих

веществ (7,5 ± 0,5) %, разливают в колбы и стерилизуют при (116 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин.

Солодовое сусло можно заменить виноградным суслом, которое готовят аналогично солодовому.

7.3.16.2 Сусловый агар

К 1,0 дм^3 солодового сусла с массовой долей сухих веществ (7,5 ± 0.5) % прибавляют 30 г агара. Среду нагревают до полного расплавления агара и фильтруют через вату или фильтровальную бумагу. Охлаждают до (50 ± 5)°С и устанавливают pH так, чтобы при температуре 25°С он составлял (3,6 ± 0,1) ед. с помощью молочной кислоты. Фильтрат разливают в колбы и стерилизуют при (116 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин.

7.3.16.3 Среда Сабуро

К 1,0 дм^3 дистиллированной воды добавляют 18 г агара и оставляют на 30 мин для его набухания, затем 40 г мальтозы или глюкозы и 10 г пептона, нагревают до полного растворения (при наличии осадка фильтруют). Устанавливают pH так, чтобы при температуре 25 °С он составлял (6,5 ± 0,1) ед. pH с помощью молочной кислоты. Разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при (116 ± 1)°С в течение (20 ± 1) мин.

7.3.16.4 Сывороточный агар — среду готовят на основе сывороточного агара БФ по ГОСТ 10444.12, используют при анализе пробиотических продуктов на молочной основе.

7.3.16.5 Для повышения селективности среды Сабуро по 7.3.16.3 и сывороточного агара по 7.3.16.4, непосредственно перед использованием в них добавляют водные растворы антибиотиков, приготовленные по 7.3.16.7-7.3.16.10.

Растворы антибиотиков вносят в расплавленные и охлажденные до (46 ± 1) °С питательные среды по схеме, указанной в таблице 1.

Таблица 1 — Схема добавления растворов антибиотиков в среду Сабуро и сывороточный агар

Объем питательной среды, см^3	Объемы вносимых в среду растворов антибиотиков, см^3			
	пенициллин	стрептомицин	неомицин	хлорамфеникол (левомицетин)
980	10	10	-	-
930	-	-	70	-
975	-	-	-	25

Среды с антибиотиками хранению не подлежат.

7.3.16.6 Агар с дихлораном, бенгальским розовым, хлорамфениколом и хлортетрациклина гидрохлоридом готовят по ГОСТ 10444.12.

7.3.16.7 Приготовление водного раствора пенициллина

Во флакон с бензилпенициллина натриевой или калиевой солью, содержащим 500000 ЕД, добавляют 5-7 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают до растворения. Содержимое флакона переносят в стерильную мерную колбу, вместимостью 100 $см^3$, и доводят до метки стерильной дистиллированной водой при температуре от 35°С до 40°С. Получают раствор пенициллина, содержащий 5000 ЕД/$см^3$.

При использовании пенициллина другой активности, его растворяют в мерной колбе соответствующей вместимости до 5000 ЕД/$см^3$.

Раствор готовят непосредственно перед внесением в среду.

7.3.16.8 Приготовление водного раствора стрептомицина

400 мг стрептомицина сульфата или дигидрострептомицина сульфата вносят в стерильную мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 10,0-20,0 $см^3$ стерильной дистиллированной воды при температуре от 35°С до 40°С, перемешивают до растворения, затем доливают стерильной дистиллированной водой до метки.

Массовая концентрация стрептомицина в растворе 4 г/$дм^3$.

Раствор готовят непосредственно перед внесением в среду.

7.3.16.9 Приготовление водного раствора неомицина

500 мг неомицина сульфата вносят в стерильную мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 10,0-20,0 $см^3$ стерильной дистиллированной воды при температуре от 35°С до 40°С. перемешивают до растворения, затем доливают стерильной дистиллированной водой до метки.

Массовая концентрация неомицина в растворе 5 г/$дм^3$.

Раствор готовят непосредственно перед внесением в среду.

7.3.16.10 Приготовление водного раствора хлорамфеникола (левомицетина)

400 мг хлорамфеникола (левомицетина) вносят в стерильную мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 10,0-20,0 $см^3$ стерильной дистиллированной воды при температуре от 35°С до 40°С, перемешивают до растворения, затем доливают стерильной дистиллированной водой до метки.

Массовая концентрация хлорамфеникола в растворе 4 г/$дм^3$.

Раствор готовят непосредственно перед внесением в среду.

7.3.16.11 Приготовление 1 %-ного спиртового раствора хлорамфеникола — 1 %-ный спиртовый раствор хлорамфеникола готовят и применяют по ГОСТ 10444.12.

7.3.16.12 Приготовление 0,1 %-ного водного раствора хлортетрациклина гидрохлорида — 0,1 %- ный водный раствор хлортетрациклина гидрохлорида готовят и применяют по ГОСТ 10444.12.

7.3.17 Питательные среды и растворы реактивов для выявления *L. monocytogenes*

7.3.17.1 Бульоны Фрейзера для первичного селективного обогащения (полуконцентрированный) и вторичного селективного обогащения (с полной концентрацией селективных компонентов) листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

Готовые среды разливают в стерильные колбы: полуконцентрированный бульон Фрейзера — в объемах, в 9 раз превышающих массу (объем) засеваемого продукта; бульон Фрейзера с полной концентрацией селективных компонентов — по 90 $см^3$, и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 6°С не более трех недель.

7.3.17.2 Селективный накопительный бульон (UVM), питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I) для первичного селективного обогащения и селективный накопительный бульон (UVM II), питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) для вторичного селективного обогащения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

7.3.17.3. Агар *Listeria* по Оттавиани и Агости (ALOA) — основную (первую) селективную дифференциально-диагностическую плотную среду для выделения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

Допускается использование других хромогенных сред с тем же составом.

В качестве второй среды необходимо использовать одну из следующих сред - Оксфорд агар (Oxford agar), Палкам агар (PALCAM agar), Бриллианс Listeria агар (BRILLIANCE LISTERIA agar), питательный агар для выделения листерий (ПАЛ). Выбор второй среды - на усмотрение испытательной лаборатории.

7.3.17.3. Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ) — дополнительную (вторую) селективную дифференциально-диагностическую плотную среду для выделения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

7.3.17.4 PALCAM-агар (полимиксин-акрифлавин-лития хлорид-цефтазидим-эсхулин-маннитол — агар) — дополнительную (вторую) селективную дифференциально-диагностическую плотную среду для выделения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8°С.

7.3.17.5 Оксфорд-агар — дополнительную (вторую) селективную дифференциально-диагностическую плотную среду для выделения листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

При приготовлении среды допускается замена комплекса рекомендованных в 7.3.16.5 на полимиксин В сульфат в количестве 500000 МЕ на 1 $дм^3$ среды.

Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8°С.

7.3.17.6 Бриллианс Listeria агар (BRILLIANCE LISTERIA agar) готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

7.3.17.7 Питательный агар с 1 % глюкозы (МПА с 1 % глюкозы) и питательный бульон с 1 % глюкозы (МПБ с 1 % глюкозы) — для изучения культурально-морфологических свойств листерий готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1. в том числе из сухих основ промышленного производства — по 7.3.11.

7.3.17.8 Трипкаэо-соевый бульон (TSB) и трипказо-соевый агар (TSA) — для изучения культурально-морфологических свойств листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

7.3.17.9 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (ТБУЕВ)/Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) для изучения культурально-морфологических свойств листерий готовят в соответствии с ГОСТ 32031.

7.3.17.10 Кровяной агар для определения гемолитических свойств листерий К растопленному и охлажденному до 45-50 °С питательному агару с 1% глюкозы (см. 7.3.17.8) добавляют 5 % по объему дефибринированной крови барана (см. 7.3.15.8). Разливают в чашки Петри диаметром 90 мм по 15 $см^3$ среды и подсушивают при 37 °С. Посев производят в теплые чашки.

7.3.17.11 Питательный агар с эритроцитами барана для определения β-гемолитической активности *Listeria monocytogenes*

Дефибринированную или стабилизированную цитратом кровь барана центрифугируют в асептических условиях 30 мин при 900 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Осадок суспендируют в стерильном изотоническом растворе хлористого натрия до первоначального объема, добавляют в количестве 5 % по объему к растопленному и охлажденному до 45°С — 50°С питательному агару. Разливают в чашки Петри по 10 $см^3$, подсушивают при 37°С. Чашки используют для посева теплыми.

7.3.17.12 Среда для определения подвижности — среда для изучения физиолого-биохимических свойств листерий

20 г гидролизата казеина ферментативного, 6 г пептона мясного ферментативного и 5 г агара растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, устанавливают pH так, чтобы при температуре 25°С после стерилизации его значение составляло (7,3 + 0,2) ед. pH. разливают в пробирки по 5 -7 $см^3$ и автоклавируют 15 мин при температуре 121 °С.

7.3.17.13 Среды Гисса с маннитом, рамнозой, ксилозой

Среды Гисса с маннитом, рамнозой, ксилозой — для изучения ферментативных свойств и идентификации бактерий Listeria monocytogenes готовят по ГОСТ 10444.1.

7.3.17.14 Среды для определения лецитиназной активности листерий (лецитин-агар)

Готовят основы сред в двух вариантах: 1- й вариант — к среде ГРМ-агар (ГРМ No 1), приготовленной по 7.3.11, перед стерилизацией добавляют активированный уголь, растертый до порошкообразного состояния, до концентрации 0,5 % (вес/объем).

2- й вариант — готовят аналогично, но без добавления активированного угля. К стерилизованной и охлажденной до 40°С — 50°С первому варианту основы питательной среды в условиях асептики добавляют эмульсию желтка куриного яйца, приготовленную по ГОСТ 32031, в количестве 5 % по объему. Разливают в чашки Петри по 20 $см^3$ и подсушивают при 37°С.

Аналогично готовят среду на втором варианте основы с добавлением желтка, но без добавления активированного угля.

7.3.17.15 Среды для проведения КАМП (CAMP) теста для идентификации бактерий *Listeria monocytogenes* готовят по ГОСТ 31031.

7.3.17.16 Раствор с объемной долей перекиси водорода 3 % готовят по ГОСТ 10444.1.

7.4 Приготовление разведений продуктов для посева

7.4.1 К 10 г лабораторной пробы добавляют по 90 г ($см^3$) стерильный изотонический раствор хлористого натрия или разбавленный фосфатный буферный раствор или забуференную пептонную воду до достижения общей массы или объема пробы 100 г ($см^3$), после чего смесь тщательно перемешивают до гомогенного состояния вручную круговыми движениями либо с использованием аппарата для встряхивания жидкостей или гомогенизатора перистальтического типа. Пипетку осторожно промывают до 10 раз полученной смесью до верхнего уровня имеющихся на ней делений. Получают первое разведение продукта (1×10^1).

7.4.2 При анализе сыров и творожных продуктов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами для приготовления разведений используют раствор лимоннокислого натрия по 7.3.7.

7.4.3 Первое разведение для сухих кисломолочных продуктов и БАД на основе пробиотических микроорганизмов, высушенных со средой культивирования, нейтрализуют. Для этого на каждые 10 $см^3$ разведения в стерильную посуду добавляется 1,0 $см^3$ стерильного раствора натрия гидрокарбоната с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$; содержимое перемешивают с использованием стерильных приспособлений или шуттель-аппарата. Общая масса первого разведения пробы с разбавителем и нейтрализующим раствором должна составлять 100 г.

7.4.4 При анализе продуктов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами в капсулированном виде, первое разведение капсул суспендируют. Для этого 10 г образца капсул переносят в 90 г разбавленного фосфатного буферного раствора, нагретого до температуры не выше 40°С. Допускается использование гомогенизатора перистальтического типа, время гомогенизации 2 — 2,5 мин.

7.4.5 При анализе продукции, обогащенной пробиотическими микроорганизмами в микрокапсулированной форме, при приготовлении первого разведения необходимо освободить микроорганизмы от покрытий путем растворения последних.

7.4.6 В случае покрытия из полисахаридов, необходимо энергичное смешивание в течение 10 - 15 мин круговыми движениями.

7.4.7 В случае двойного покрытия из полисахаридов и белков/пептидов перемешивание первого разведения должно продолжаться не менее 21 мин: осторожное размешивание (без образования пузырьков) в течение двух минут, отстаивание в течение пяти минут, операции повторяют три раза для полного растворения покрытия.

7.4.8 Далее проверяют состояние покрытий под микроскопом (х1000). Если покрытия полностью не растворились или клетки остались в агрегированном состоянии, процедуру повторяют.

7.4.9 При необходимости последующие десятикратные разведения продукта готовят, добавляя в 9 $см^3$ стерильного разбавителя (изотонического раствора хлористого натрия, разбавленного фосфатного буферного раствора или раствора лимоннокислого натрия) по 1 $см^3$ из предыдущего разведения продукта. При этом смесь каждый раз тщательно перемешивают, осторожно промывая пипетку до 10 раз полученной смесью. Для приготовления каждого разведения берут новую стерильную пипетку, при этом вводят пипетку в пробирку не более, чем на 2 -3 см ниже поверхности смеси.

Время от момента приготовления разведений до посева не должно превышать 30 мин. Перед посевом приготовленные разведения осторожно встряхивают.

8 Проведение анализа

8.1 Выявление бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

8.1.1 Сущность метода

Метод основан на посеве определенного количества продукта и (или) его разведений в жидкую селективную обогатительную среду с лактозой и желчью, инкубировании посевов при температуре 37°С, регистрации признаков роста колиформных бактерий по накоплению газа в пробирке Дархама (поплавке), пересеве из пробирок или колб, в которых отмечены признаки роста, в пробирки с подтверждающей жидкой средой или на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов к колиформным бактериям по культуральным и/или биохимическим признакам.

8.1.2 Проведение анализа

Для посева используют те количества (объемы) пробиотических продуктов или соответствующих им десятикратных разведений, в которых предусматривается отсутствие БГКП (колиформных бактерий). Анализ проводят в двух повторностях.

8.1.2.1 Пробиотические продукты кисломолочные и сквашенные на молокосодержащей основе жидкие и пастообразные, в том числе мороженое, жидкие БАД с пробиотическими микроорганизмами. напитки безалкогольные, обогащенные пробиотическими микроорганизмами, в том числе напитки брожения, предварительно подвергают нейтрализации по 7.1.5, 7.1.7, 7.1.8. Допускается разводить нормируемые объемы проб напитков брожения и концентратов для напитков безалкогольных, обогащенных пробиотическими микроорганизмами, перед посевом в жидкую селективную обогатительную среду в стерильной питьевой воде как указано в ГОСТ 30712.

Пробы сухих пробиотических продуктов и ингредиентов, содержащих пробиотические микроорганизмы. БАД на основе пробиотических микроорганизмов сухих и высушенных в средах культивирования, засевают после разведения в стерильном изотоническом растворе хлористого натрия (разбавленном фосфатном буферном растворе) и при необходимости — нейтрализации по 7.4.3.

8.1.2.2 Подготовленные пробиотические продукты на молочной и молокосодержащей основе или их разведения засевают в среду Кесслер с лактозой нормальной концентрации по 7.3.13.1, в том числе пробы массой (объемом) 1 г ($см^3$) — в пробирки с 10 $см^3$ среды (при соотношении инокулята продукта и среды 1:10. не менее);

пробы массой (объемом) свыше 1 г (см^3) и до 10 г (см^3) — в колбы с 50 см^3 среды (при соотношении инокулята продукта и среды 1:5, не менее).

8.1.2.3 Подготовленные напитки безалкогольные, концентраты для напитков безалкогольных, обогащенные пробиотическими микроорганизмами, засевают в среду Кесслер с лактозой двойной концентрации по 7.3.13.1, в том числе пробы объемом 100 см^3 — в колбы со 100 см^3 среды, разведения проб объемом 10 см^3 — в пробирки с 10 см^3 среды, соблюдая соотношение инокулята продукта и среды 1:1, не менее. Подготовленные напитки брожения, обогащенные пробиотическими микроорганизмами. засевают в среду Кесслер с лактозой нормальной концентрации по 7.3.13.1, в том числе пробы объемом 1 см^3 и разведения проб объемом 1 см^3 — в пробирки с 10 см^3 среды, соблюдая соотношение инокулята продукта и среды 1:10, не менее.

8.1.2.4 Подготовленные пробы БАД на основе пробиотических микроорганизмов и ингредиентов. содержащих пробиотические микроорганизмы, или их разведения засевают в жидкие селективные обогатительные среды с лактозой по пп. 7.3.13.1 или 7.3.13.2 двойной концентрации, в том числе пробы массой (объемом) 10 г (см^3) или разведения проб объемом 10 см^3 — в пробирки с 10 см^3 среды, соблюдая соотношение инокулята продукта и среды 1:1, не менее. Для анализа образцов массой 2 г, подготовленную пробу засевают в пробирки с 10 см^3 среды или используют удвоенное число пробирок для исходного разведения объемом 10 см^3.

8.1.2.5 Посевы помещают в термостат при температуре (37 ± 1)°С на (48 ± 2) ч, с предварительным учетом положительных результатов через (24 ± 2) ч.

8.1.2.6 Положительными считают результаты посева при наличии таких признаков роста как газообразование. помутнение, затрудняющее выявление газообразования. Для окончательного заключения о наличии в продукте БГКП (колиформных бактерий), из каждой положительной колбы или пробирки производят высев бактериологической петлей на поверхность одной из агаризованных селективно диагностических сред Эндо или Левина (см. 7.3.13.5) или в пробирки с одной из подтверждающих жидких сред с лактозой нормальной концентрации (см. 7.3.13.1- 7.3.13.4). Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

8.1.2.7 Допускается считать положительными посевы пробиотических продуктов на молочной и молокосодержащей основе в среде Кесслер с лактозой, а также все посевы на жидких селективных обогатительных средах нормальной концентрации при наличии в них отчетливого газообразования. В таких случаях допускается выдавать заключение о наличии колиформных бактерий в анализируемой массе (объеме) продукта без

подтверждения их принадлежности путем пересева на селективнодиагностические среды и жидкие среды с лактозой.

8.1.2.8 При отсутствии признаков роста на жидких селективных обогатительных средах (газообразование, помутнение, образования осадка или пленок, изменение цвета среды) через 48 ч результаты посева считают отрицательными и дают заключение об отсутствии БГКП (колиформных бактерий) в анализируемой массе (объеме) продукта.

8.1.3 Обработка результатов

8.1.3.1 При отсутствии на среде Эндо или Левина колоний, типичных для БГКП (колиформных бактерий) (на среде Эндо — красных с металлическим блеском или без него, розовых и бледнорозовых: на среде Левина — черных с металлическим блеском, темных с черным центром, сиреневых с темным центром) засеянная масса (объем) продукта считается незагрязненной ими, то есть в анализируемом продукте БГКП не обнаружены.

8.1.3.2 При наличии на среде Эндо или Левина типичных или подозрительных для БГКП (колиформных бактерий) колоний из них делают препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. Обнаружение грамотрицательных не содержащих спор палочек указывает па наличие БГКП (колиформных бактерий) в анализируемой массе (объеме) продукта.

8.1.3.3 При учете результатов подтверждения на жидкой среде, пробирки с жидкими селективными средами с лактозой нормальной концентрации по 7.3.13.1-7.3.13.4. засеянные по 8.1.2.6, в которых отмечено образование газа после (24 ± 2) ч или после (48 ± 2) ч, считают положительными. Если в течение (24 ± 2) ч в посевах нет образования газа, то продолжают наблюдение до (48 ± 2) ч. Выявление газообразования указывает па наличие БГКП (колиформных бактерий) в анализируемой массе (объеме) продукта.

8.1.3.4 При обнаружении колиформных бактерий только в одной из повторностей анализ следует повторить, как указано в ГОСТ 30712. Если колиформные бактерии будут вновь обнаружены в обеих или одной из повторностей, то это свидетельствует об обнаружении колиформных бактерий в анализируемой массе (объеме) продукта.

8.2 Определение презумптивных *Escherichia coli*

8.2.1 Анализ на наличие в пробиотических продуктах презумптивных *Escherichia coli* проводят в соответствии с ГОСТ 31708 со следующими дополнениями.

8.2.2 Подготовка проб, предварительная инкубация и селективное обогащение

8.2.2.1 Подготовку проб к анализу проводят с учетом положений 7.1.5, 7.1.7. 7.1.8.

Размер пробы для анализа соответствует массе (г) или объему ($см^3$) продукта, в котором нормируют отсутствие *Escherichia coli*, в соответствии с нормативными правовыми актами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

Для выявления презумптивных *Escherichia coli* в сухих специализированных продуктах, содержащих пробиотические микроорганизмы, проводят посев определенных количеств продукта с предварительной инкубацией в жидкой неселективной среде.

Для выявления презумптивных *Escherichia coli* в продуктах жидкой и пастообразной консистенции проводят посев определенных количеств продукта или его соответствующих разведений непосредственно в жидкую селективную обогатительную питательную среду лаурилсульфат-бульон (см. 7.3.13.3) по ГОСТ 31708.

8.2.2.2 Асептически взвешивают определенное количество сухого продукта, подготовленного по 7.1.6. и помещают в колбы с забуференной пептонной водой по 7.3.8. предварительно нагретой в инкубаторе до температуры 37 °С, исходя из соотношения продукта и среды 1:9 (масса к объему или объем к объему). Смесь тщательно перемешивают. Допускается доводить активную кислотность до 7,0 ед. pH непосредственно в смеси для предварительной инкубации при использовании стерильных растворов гидроокиси натрия или соляной кислоты и проверяя pH индикаторной бумагой.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

8.2.2.3 На следующий день из этих колб переносят 1,0 $см^3$ культуральной жидкости в пробирку с 9 $см^3$ жидкой селективной обогатительной средой лаурил-сульфат-бульон (см. 7.3.13.3), и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 ч.

Через 24 ч посевы просматривают, при отсутствии признаков роста пробирки оставляют в термостате еще на (24 ± 1) ч. При наличии признаков роста (газообразование, образование хлопьев, потемнение) производят пересев в пробирки с 10 см3 жидкой селективной среды ЕС-бульон по 7.3.13.4.

Посевы инкубируют при температуре 44 °С до 48 ч.

8.2.3 Подтверждение принадлежности микроорганизмов, выросших в жидких средах по 7.2.2.3, к презумптивным *E. coli* и оценка результатов посева — по ГОСТ 31708.

8.2.4 При необходимости подтверждение принадлежности обнаруженных презумптивных *E. coli* и дифференциацию от других видов рода *Escherichia* осуществляют по ГОСТ 30726 (с учетом приложения А), подтверждение принадлежности к *E. coli* О157 - по ГОСТ 32011 после пересева микроорганизмов. выросших в жидких средах, на поверхность среды Эндо, Левина (см. 7.3.13.5) по ГОСТ 26670.

8.3 Определение сальмонелл проводят по ГОСТ 31659 со следующими дополнениями.

8.3.1 Предварительное обогащение в жидкой неселективной среде

Для посева используют те количества пробиотических продуктов, в которых регламентируется отсутствие бактерий рода *Salmonella*. Пробу продукта, подготовленную по 7.1.5, асептично переносят в колбу со средой для предварительного обогащения (забуференной пептонной водой) по 7.3.8., комнатной температуры при соотношении продукта и среды 1:9 (масса к объему или объем к объему). При использовании больших количеств среды для предварительного обогащения (например, 1 дм или более) рекомендуется перед внесением анализируемого образца нагреть забуференную пептонную воду до температуры от 34°С до 38°С

Допускается доводить активную кислотность до 7,0 ед. pH непосредственно в смеси для предварительной инкубации при использовании стерильных растворов гидроокиси натрия или соляной кислоты, проверяя pH индикаторной бумагой.

Например, при необходимости подтверждения отсутствия бактерий рода *Salmonella* в 25 г продукта. пробу размером 25 г инокулируют в 225 $см^3$ забуференной пептонной воды.

Для ингибирования присутствующих в продуктах жизнеспособных пробиотических микроорганизмов и создания условий для обогащения сальмонелл непосредственно перед посевом в забуференную пептонную воду добавляют вспомогательные компоненты, не препятствующие росту сальмонелл по ГОСТ ISO 27205.

При анализе проб, содержащих пробиотические микроорганизмы в количествах до 10^8 КОЕ/г ($см^3$), используют забуференную пептонную воду с ванкомицином (10 $мг/дм^3$).

При анализе проб, содержащих пробиотические микроорганизмы в количествах выше 10^8 КОЕ/г($см^3$), используют забуференную пептонную воду двойной концентрации (по ГОСТ 31659) с добавлением ванкомицина (10 $мг/дм^3$), малахитового зеленого (40 $мг/дм^3$) и молока (10 $г/дм^3$).

Примечание — Добавление молока для уменьшения токсических свойств малахитового зеленого на бактерии рода *Salmonella* необходимо только для проб пробиотических продуктов и БАД, не содержащих молока.

Допускается использовать более высокий коэффициент разбавления, в случае необходимости, чтобы уровень пробиотических микроорганизмов в среде для предварительного обогащения непосредственно после добавления пробы к среде не превысил 10^{10} КОЕ/г ($см^3$).

Посевы инкубируют в течение (18 ± 2) ч при температуре (36 ± 1) °С.

8.3.2 Обогащение в жидкой селективной среде

Из посевов с предварительным обогащением по окончании инкубации делают пересевы параллельно в две жидкие среды для селективного обогащения: среду Раппапорта-Вассилиадиса (RVS-бульон) по 8.3.14.1 и одну из двух сред — селенитовую по 7.3.14.3,. или 7.3.14.4. бульон Мюллера-Кауфмана тетратионатно-новобиоциновый (MKTTn-бульон), соблюдая соотношение инокулята и среды не менее 1:9.

Посевы в RVS-бульоне инкубируют при температуре (41,5 ± 1.0) °С в течение (24 ± 3) ч. а во второй используемой для анализа среде — при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. 7.3.3 Высев из пробирок с жидкими селективными средами на поверхность агаризованных дифференциально-диагностических сред и обработку результатов проводят по ГОСТ 31659.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл на каждой из сред конечный результат анализа записывают как отрицательный, то есть в анализируемой массе продукта сальмонеллы отсутствуют.

При наличии на любой из питательных сред на чашках Петри типичных или подозрительных колоний на сальмонеллы, проводят изучение выделенных на чашках колоний, подтверждение их принадлежности к бактериям рода *Salmonella*, обработку результатов по ГОСТ 31659 со следующими дополнениями.

8.3.4. Из каждой среды на чашке Петри, содержащей колонии, подозрительные на принадлежность к сальмонеллам, выбирают хорошо изолированную колонию и высевают штрихом (на скошенную поверхность) и уколом (в глубину столбика) на трехсахарный TSI-агар (см. 7.3.14.6) или среду Кристенсена с мочевиной (см. 7.3.14.7). При наличии смешанного роста предварительно делают пересев на поверхность любой из агаризованных питательных сред (питательный агар, мясопептонный агар, триптозный ГРМ-агар, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом), приготовленных по 7.3.11, для получения изолированных колоний. После проверки чистоты культуры путем микроскопирования окрашенных по Граму мазков отобранные колонии засевают в пробирки с TSI-агаром или средой Кристенсена с мочевиной.

Пробирки с посевами выдерживают в термостате при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч.

8.3.5 По окончании инкубации производят интерпретацию признаков роста на углеводных средах по ферментации сахаров и по расщеплению мочевины.

Культуры сальмонелл ассимилируют и сбраживают глюкозу, не ассимилируют лактозу, образуют сероводород, не разлагают мочевину. Покраснение или пожелтение (в зависимости от добавленного индикатора) скошенной части столбика среды указывает на

образование кислоты в результате ферментации лактозы, сахарозы или обоих сахаров. Покраснение самого столбика указывает на расщепление глюкозы. Восстановление цвета среды до исходного (бледно-розовый) свидетельствует о расщеплении мочевины.

Об образовании сероводорода судят по почернению среды в столбике.

Если культуры ферментируют лактозу с образованием газа и расщепляют мочевину, они не принадлежат к бактериям рода *Salmonella*.

Культуры, не ферментирующие лактозу и не расщепляющие мочевину, но ферментирующие глюкозу (с образованием или без образования газа), подвергаются дальнейшему изучению.

Культуры, ферментирующие глюкозу без образования газа, подозрительны как брюшнотифозные или дизентерийные.

Культуры, ферментирующие глюкозу с образованием газа и продуцирующие сероводород, могут принадлежать к роду *Salmonella*.

Если ни в одной из пробирок не обнаружено ни одной характерной для сальмонелл реакции, то результат считают отрицательным и дают заключение об отсутствии в анализируемой массе продукта бактерий рода *Salmonella*.

Допускается использовать углеводные среды TSI-агар, агар Клиглера, среду Олькеницкого, указанные в ГОСТ 31659, без мочевины. В таких случаях интерпретацию результатов и тестирование способности культур расщеплять мочевину на отдельной среде агаре Кристенсена проводят по ГОСТ 31659.

8.3.6 Дальнейшее изучение культур, ферментирующих глюкозу с образованием или без образования газа, образующих и не образующих сероводород, в том числе ферментирующих лактозу, подтверждение их принадлежности к бактериям рода *Salmonella* и обработку результатов проводят по ГОСТ 31659.

8.4 Выявление коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus*

8.4.1 Анализ на наличие в пробиотических продуктах коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* проводят в соответствии с ГОСТ 31746 со следующими дополнениями.

8.4.2 Проведение анализа

8.4.2.1 Для выявления коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* в сухих специализированных продуктах, содержащих пробиотические микроорганизмы, проводят посев определенного количества продукта или определенного количества его соответствующего разведения с предварительной инкубацией в жидкой неселективной среде.

Для выявления коагулазоположительных стафилококков и *S. aureus* в продуктах жидкой и пастообразной консистенции проводят посев определенных количеств продукта или его соответствующего разведения непосредственно в жидкие селективные питательные среды.

Перед посевом для выявления *S. aureus* в жидких средах создают анаэробные условия кипячением пробирок на водяной бане при (100 ± 1) °С в течение 15 мин либо путем инкубирования пробирок в анаэробных условиях по ГОСТ 31746.

8.4.2.2 Асептически взвешивают определенное количество сухого продукта, подготовленного по 7.1.6. и помещают в колбы с забуференной пептонной водой по 7.3.8 для предварительной инкубации при соотношении продукта и среды 1:9. Тщательно перемешивают. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. На следующий день пипеткой переносят 1,0 $см^3$ культуральной жидкости в пробирку с солевым бульоном (см. 7.3.15.1) или с бульоном Жиолитти-Кантони (см. 7.3.15.2) и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 ч.

8.4.2.3 Жидкие и пастообразные продукты на молочной основе, подготовленные по 7.1.5, 7.1.7. 7.1.8. не подвергающиеся предварительной инкубации, в определенных количествах или объемах засевают в пробирки или колбы с солевым бульоном по 7.3.15.1 при соотношении продукта и среды 1:9. инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 ч. Немолочные жидкие и пастообразные продукты, подготовленные по 7.1.5. 7.1.7. 7.1.8, не подвергающиеся предварительной инкубации, в определенных количествах или объемах засевают в пробирки или колбы с солевым бульоном по 7.3.15.1 или в пробирки или колбы с модифицированным Жиолитти-Кантони бульоном по 7.3.15.2 при соотношении продукта и среды 1:9. инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24-48 ч.

8.4.2.4 Учитывают признаки роста в жидких селективных питательных средах через 24 ч инкубации. О предположительном присутствии коагулазоположительных стафилококков в солевом бульоне свидетельствует помутнение среды, в бульоне Жиолитти-Кантони — редукция теллурита калия. При отсутствии признаков роста пробирки продолжают инкубировать до 48 ч.

8.4.2.5 Из пробирок с признаками роста производят пересев петлей для получения изолированных колоний на поверхность одной из предварительно подсушенных питательных сред: Байрд-Паркер агара (см. 7.3.15.3), ЖСА (см. 7.3.15.4) или МСА (см. 7.13.5.5). Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С от 24 до 48 ч.

8.4.2.6 Изучение выделенных на чашках колоний и подтверждение их принадлежности к коагулазоположительным стафилококкам и к *S. aureus*, обработку результатов проводят по ГОСТ 31746.

8.5 Определение количества дрожжей и плесневых грибов

8.5.1 Анализ для определения количества дрожжей и плесневых грибов в специализированных пищевых продуктах, содержащих пробиотические микроорганизмы. проводят в соответствии с ГОСТ 10444.12 со следующими дополнениями.

8.5.2 Проведение анализа

8.5.2.1 Подготовку проб и приготовление разведений для посева проводят согласно 7.1, 7.4.

8.5.2.2 Для анализа проб продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы в количествах выше 10^8 КОЕ/г($см^3$) или дрожжи в качестве заквасочной культуры, используют питательные среды с добавлением неомицина, хлорамфеникола или хлорамфеникола и хлортетрациклина гидрохлорида.

8.5.3 Инокуляция чашек

Для определения количества дрожжей и плесневых грибов вносят по 1,0 $см^3$ жидкого продукта из каждой пробы, подготовленной по 7.1.5-7.1.8 или по 1,0 $см^3$ разведений 1:10 и 1:100. подготовленных по 7.4, в две чашки Петри, каждую с заранее промаркированными крышками. Посевы в чашках Петри заливают не позднее чем через 15-20 мин 14,0 $см^3$ одной из агаризованных сред по 7.3.16.2- 7.3.16.4, 7.3.16.6, расплавленных и охлажденных до (45 ± 1)°С. Среду немедленно тщательно перемешивают и оставляют для застывания.

Допускается использовать поверхностный метод посева с инокуляцией 1 $см^3$ подготовленных проб жидкого продукта или разведений продукта иной консистенции на поверхность подсушенных агаризованных сред по 7.3.16.2-7.3.16.4, 7.3.16.6 в чашках Петри путем равномерного распределения инокулята, выдерживания в течение 10 мин и последующего удаления невпитавшейся жидкости стерильной пипеткой.

Поверхностный метод посева не применяется к специализированным пищевым продуктам, содержащим в своем составе аэробные по природе молочнокислые микроорганизмы рода *Lactococcus* и вида *Streptococcus thermophilus*.

8.5.4 Подсчет колоний, отбор колоний для подтверждения принадлежности к дрожжам и плесеням. обработку и представление результатов проводят по ГОСТ 10444.12.

Примечание — Следует учитывать, что из-за низкого содержания азотистых соединений и низкого уровня pH в среде по 7.3.16.4 молочнокислые микроорганизмы,

содержащиеся в составе специализированных пищевых продуктов на молочной основе, могут давать точечные пылевидные колонии, которые не подлежат учету.

8.6 Определение бактерий *Listeria monocytogenes.*

8.6.1 Анализ на наличие в пробиотических продуктах бактерий *Listeria monocytogenes* проводят по ГОСТ 32031 со следующими дополнениями.

8.6.2 Подготовку проб к анализу проводят с учетом положений 7.1.5, 7.1.7, 7.1.8 и нормативных правовых документов, действующих на территории государства принявшего стандарт.

8.6.3 Проведение анализа

8.6.3.1 Размер пробы для анализа соответствует массе (г) или объему продукта ($см^3$), в котором нормируют отсутствие бактерий *Listeria monocytogenes,* в соответствии с нормативными правовыми актами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

8.6.3.2 Анализируемую пробу X (г или $см^3$) вносят в селективную среду первичного обогащения, исходя из соотношения продукта и среды 1:9 (масса к объему или объем к объему).

Посевы культивируют при температуре (30 ± 1)°С в течение (24 ± 3) ч.

Примечания:

1 Первичное селективное обогащение необходимо для восстановления поврежденных клеток листерий, а также для ингибирования роста конкурентной микрофлоры пробиотических продуктов (живых пробиотических и молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus spp., Lactococcus spp., Streptococcus spp.*).

2 В виду сходства биологических характеристик, питательных потребностей, оптимумов pH. температуры для роста листерий и молочнокислых микроорганизмов, на этапах первичного и вторичного обогащения листерий используют питательные среды с селективными добавками, к которым проявляют наибольшую чувствительность присутствующие в составе продуктов пробиотические микроорганизмы.

3 При этом учитывают, что лактококки и стрептококки ингибируются в присутствии акрифлавина и налидиксовой кислоты. Чувствительность к антимикробным агентам бактерий рода *Lactobacillus* зависит от штамма, но большинство промышленно-значимых штаммов проявляет чувствительность к полимиксину.

8.6.4 Пересев культуральной жидкости из среды первичного обогащения в среду вторичного обогащения, инкубирование и последующий пересев на плотные дифференциально-диагностические среды осуществляют по ГОСТ 32031.

8.6.5 Изучение выделенных на чашках колоний, подтверждение их принадлежности к *Listeria monocytogenes* и обработку результатов проводят по ГОСТ 32031.

Приложение А
(справочное)
Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ

А.1 Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ приведена в таблице А.1.

Таблица А.1

Структурный элемент	Наименование технического регламента или нормативного правового акта	Государство-участник СНГ
Раздел 3, раздел 8	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011 Закон РУз «О качестве и безопасности пищевой продукции» Технический регламент «Безопасность пищевой продукции»	AM, BY, KZ, KG, RU UZ TD
Раздел 3, раздел 8	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания» ТР ТС 027/2012	AM, BY, KZ, KG, RU
Раздел 3, раздел 8	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» ТР ТС 033/2013 Технический регламент «Безопасность молока и молочной продукции»	AM, BY, KZ, KG, RU TD

УДК 579.67:006.354 МКС 67.050

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, содержащие пробиотические микроорганизмы, обогащенные пробиотическими микроорганизмами, биологически активные добавки к пище на основе пробиотических микроорганизмов, методы микробиологического анализа посторонних микроорганизмов

Сведения о разработчике:

Разработчик межгосударственного стандарта:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14, тел. +7 (495) 698-53-30, e-mail: mailbox@ion.ru, tashenka13@inbox.ru.

Руководитель организации – разработчика

ВРИО Директора ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н. _____ (подпись) Н.Р. Ефимочкина

Руководители разработки:

Заведующая лабораторией биобезопасности и анализа нутримикробиома, д.м.н. _____ (подпись) С.А. Шевелева

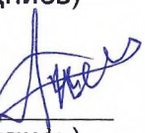
Заведующая лабораторией витаминов и минеральных веществ, к.б.н. _____ (подпись) Н.В. Жилинская

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома, к.б.н. _____ (подпись) Ю.М. Маркова

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома _____ (подпись) И.Б. Быкова

Научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома _____ (подпись) В.В. Стеценко

Младший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома	 (подпись)	Ю.В. Смотрина
Младший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома	 (подпись)	А.С. Полянина