|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ**  **(ЕАСС)**  **EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION**  **(EASC)** | | |
|  | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ ISO 15213-1-**  *(проект, KZ,*  *первая редакция)* |

**МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ**

**Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Сlostridium spp.**

**Часть 1**

**Подсчет сульфитредуцирующих бактерий Сlostridium spp. методом подсчета колоний**

(ISO 15213:2023, IDT)

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия*

# 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 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием на праве хозяйственного ведения «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в разделе 4

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол №\_\_\_\_\_от\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

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 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту  
ISO 15213:2023 «Микробиология пищевой цепи. горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий clostridium spp. Часть 1. Подсчет сульфитредуцирующих бактерий Сlostridium spp. методом подсчета колоний» («Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *clostridium* spp. Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *clostridium*», IDT)

Международный стандарт разработан ISO/TК 34, *Пищевые продукты*, Подкомитет ПК 9, *Микробиология*, в сотрудничестве с Техническим комитетом Европейского комитета по стандартизации (CEN) CEN/TC 463, *Микробиология пищевой цепи*, в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

Перевод с английского языка (en)

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

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 (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах*

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе (каталоге) «Межгосударственные стандарты», а текст этих изменений – в информационных указателях «Межгосударственные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Межгосударственные стандарты»*

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

**Содержание**

Введение

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | Область применения | | 7 |
| 2 | Нормативные ссылки | | 8 |
| 3 | Термины и определения | | 8 |
| 4 | Принцип | | 9 |
|  | 4.1 Общие положения | | 9 |
|  | 4.2 Подготовка разбавлений | | 9 |
|  | 4.3 Подсчет | | 9 |
|  | 4.4 Подтверждение | | 10 |
| 5 | Питательные среды и реактивы | | 10 |
| 6 | Оборудование и расходные материалы | | 10 |
| 7 | Отбор проб | | 11 |
| 8 | Подготовка испытательной пробы | | 11 |
| 9 | Процедура | | 11 |
|  | 9.1 | Общие положения | 11 |
|  | 9.2 | Часть образца для анализа, исходная суспензия и разбавления | 11 |
|  | 9.3 | Тепловая обработка для отбора спор | 12 |
|  | 9.4 | Инокуляция и инкубация | 12 |
|  | 9.5 | Подсчет типовых колоний | 13 |
|  | 9.6 | Подтверждение сульфитредуцирующих *Clostridium* spp | 14 |
| 10 | Представление результатов | | 14 |
| 11 | Валидация метода | | 15 |
|  | 11.1 | Межлабораторное исследование | 15 |
|  | 11.2 | Характеристики эффективности | 15 |
| 12 | Протокол испытаний | | 16 |
| 13 | Обеспечение качества | | 16 |
| *Приложение A (обязательное)* Блок-схема процедуры | | | 17 |
| *Приложение B (обязательное)* Питательные среды и реактивы | | | 19 |
| *Приложение C (информационное)* Характеристики эффективности метода | | | 22 |
| *Приложение D (информационное)* Специальный протокол для подсчета сульфитредуцирующих Clostridium spp. в кормах | | | 25 |
| Библиография | | | 31 |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

**Введение**

Сульфитредуцирующие *Clostridium* spp. являются облигатно анаэробными, грамположительными, спорообразующими, палочковидными бактериями. Наиболее важными видами, принадлежащими к настоящей группе, являются *Clostridium (C.) perfringens, C. bifermentans, C. sporogenes и C. botulinum*. Некоторые виды могут вызывать пищевые заболевания. Как вездесущие бактерии они в основном встречаются в природе. Виды *Clostridium* обитают в почве и кишечном тракте животных и людей.

Сульфитредуцирующие *Clostridium* spp., включая *C. perfringens*, широко используются в качестве микробных индикаторов клостридиального загрязнения при производстве продуктов питания (например, мясной промышленности). Они обладают способностью производить термостойкие споры. Помимо молочной промышленности использование сульфитредуцирующих Clostridium spp. в качестве микробного индикатора ограничено относительно небольшим количеством продуктов. Его текущее применение в немолочных продуктах питания является либо указанием на фекальное загрязнение и/или индикатором санитарного/технологического контроля, связанного с потенциальным ростом и выживанием анаэробных спорообразующих бактерий.

В настоящем стандарте описывается горизонтальный метод подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. в пищевых продуктах, кормах, образцах окружающей среды и образцах с первичной стадии производства.

|  |
| --- |
| **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ** |
| **МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ**  **Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Сlostridium spp. Часть 1**  **Подсчет сульфитредуцирующих бактерий Сlostridium spp. методом подсчета колоний**  Microbiology of the food chain.Horizontal method for the detection and enumeration of clostridium spp. Part 1: Enumeration of sulfite-reducing clostridium |

**Дата введения –**

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Для защиты здоровья лабораторного персонала крайне важно, чтобы испытания по подсчету сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. проводились только в надлежащим образом оборудованных лабораториях под контролем опытного микробиолога, и чтобы при утилизации всех инкубированных материалов соблюдалась особая осторожность. Лица, использующие настоящий стандарт, должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий стандарт не претендует на рассмотрение всех аспектов безопасности, если таковые имеются, связанных с его использованием. Пользователь несет ответственность за установление соответствующих правил безопасности и охраны здоровья.

**1 Область применения**

В настоящем стандарте описывается подсчет сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. методом подсчета колоний.

Настоящий стандарт применим к:

- продуктам, предназначенным для потребления человеком;

- продуктам для кормления животных;

- образцам окружающей среды в области производства и обработки продуктов питания и кормов;

- образцам с первичной стадии производства.

ПРИМЕЧАНИЕ. Настоящий метод был проверен в межлабораторном исследовании для следующих категорий продуктов питания:

- готовые к употреблению, готовые к разогреву мясные продукты;

- яйца и яичные продукты (производные);

- обработанные фрукты и овощи;

- детские смеси и детские каши;

- многокомпонентные продукты питания или компоненты блюд.

Настоящий метод также был проверен для следующих других категорий:

- корм для домашних животных и корм для животных;

- образцы окружающей среды (производство продуктов питания или кормов).

Поскольку настоящий метод был проверен, по меньшей мере, для пяти категорий продуктов питания, он применим для широкого спектра продуктов питания. Подробную информацию о проверке см. в разделе 11 и приложении C. Поскольку метод обычно не используется для образцов на первичной стадии производства, настоящая категория не была включена в межлабораторное исследование. Поэтому для настоящей категории не были получены характеристики эффективности.

Настоящий горизонтальный метод изначально был разработан для исследования всех проб, относящихся к пищевой цепи. На основании информации, доступной на момент публикации настоящего стандарта, настоящий метод считается полностью подходящим для исследования всех проб, относящихся к пищевой цепи. Однако из-за большого разнообразия продуктов в пищевой цепи, возможно, что настоящий горизонтальный метод не подходит во всех деталях для всех продуктов. Тем не менее, ожидается, что требуемые модификации будут сведены к минимуму, чтобы они не приводили к значительному отклонению от настоящего горизонтального метода.

Настоящий метод подходит, но не ограничивается подсчетом микроорганизмов в образцах для испытаний с минимумом 10 колоний, подсчитанных на чашке. Это соответствует уровню загрязнения, который, как ожидается, будет выше 10 КОЕ/мл для жидких образцов или выше 100 КОЕ/г для твердых образцов.

**2 Нормативные ссылки**

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для датированных ссылок следует использовать только указанное издание, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения):

ISO 6887 (все части), Микробиология пищевой цепи. Подготовка проб, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологического исследования (Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination).

ISO 7218, Микробиология пищевой цепи. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям (Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations)

ISO 11133, Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение характеристик эффективности питательных сред (Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media).

ISO 19036:2019, Микробиология пищевой цепи. Оценка неопределенности измерений для количественных определений (Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations).

**3 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

ISO и IEC поддерживают терминологические базы данных для использования в стандартизации по следующим адресам:

- Платформа просмотра ISO Online: доступна по адресу <https://www.iso.org/obp>

- IEC Electropedia: доступна по адресу <https://www.electropedia.org/>

**3.1 сульфитредуцирующие *Clostridium* spp.:** род микроорганизмов семейства *Clostridiaceae*, обычно способных расти в/на железосульфитном агаре (ISA) в анаэробных условиях, образуя типовые или менее типовые колонии и демонстрируя определенные характеристики с биохимическими подтверждающими испытаниями

Примечание 1. Биохимические подтверждающие испытания приведены в 9.6.

**3.2 подсчет сульфитредуцирующих *Clostridium* spp.:** определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) *сульфитредуцирующих Clostridium spp*. (3.1) бактерий на грамм, на миллилитр, на квадратный сантиметр или на устройство для отбора проб, когда проводится указанное испытание

Примечание 1. Указанные испытания приведены в разделе 9.

**4 Принцип**

**4.1 Общие положения**

Указанное количество жидкого образца для испытаний или исходной суспензии в случае других продуктов выливается в пустую чашку Петри и хорошо перемешивается с указанной расплавленной агаровой питательной средой для формирования посева заливкой. Другие чашки готовятся в тех же условиях с использованием десятичных разведений исследуемого образца. После затвердевания агаровой питательной среды используется верхний слой для предотвращения развития распространяющихся колоний на поверхности среды. Если предполагается подсчет только спор, перед посевом необходимо провести тепловую обработку в течение 10 мин при 80 °C.

Когда ожидается, что количество КОЕ будет на пределе или почти на пределе определения, предпочтительно использовать дублирующие чашки. Если используются дублирующие чашки, минимум для суммы колоний на обеих чашках должен составлять 10 колоний. В настоящем случае уровень загрязнения, как ожидается, будет выше 5 КОЕ/мл для жидких образцов или выше 50 КОЕ/г для твердых образцов.

Метод посева заливкой с наложением (верхнего слоя) особенно подходит для подсчета продуктов, которые, как ожидается, будут содержать распространяющиеся колонии, которые могут скрывать колонии целевых микроорганизмов.

Подсчет сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. требует четырех последовательных стадий, в соответствии с указанием в Приложении A.

**4.2 Подготовка разведений**

Для подготовки десятичных разведений из исследуемой порции следует выполнять порядок проведения, указанный в серии ISO 6887.

**4.3 Подсчет**

Чашки инкубируются в анаэробных условиях при температуре 37 °C в течение 48 ч. После инкубации подсчитывается количество типовых колоний, которые показывают черное или серое или желто-коричневое окрашивание. Цвет колоний и окружающей зоны изменяется из-за образования сульфида железа (II) в результате реакции между сульфид-ионами и трехвалентным железом [Fe (III)], присутствующим в среде.

**4.4 Подтверждение**

Типовые колонии отбираются для подтверждения.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если подтверждение не проводится, результаты можно представить как «анаэробные сульфитредуцирующие бактерии».

**5 Питательные среды и реактивы**

Следует выполнять текущую лабораторную практику в соответствии с ISO 7218. Состав питательных сред и реактивов, а также их приготовление указаны в Приложении B. Для проверки эффективности питательных сред необходимо следовать порядку проведения в соответствии с ISO 11133 и Приложением B.

**6 Оборудование и расходные материалы**

Одноразовое оборудование является приемлемой альтернативой многоразовой стеклянной посуде, если оно имеет подходящие характеристики. Необходимо использовать обычное микробиологическое лабораторное оборудование (см. ISO 7218) и, в частности, следующее.

**6.1 Соответствующее оборудование для достижения анаэробной атмосферы**, герметично закрывающаяся банка или любое другое соответствующее оборудование, которое позволяет поддерживать условия анаэробной атмосферы в течение всего времени инкубации питательной среды. Могут использоваться другие системы эквивалентной эффективности, такие как анаэробные шкафы. Следует выполнять инструкции производителя по установке и обслуживанию.

Состав необходимой атмосферы может быть достигнут путем добавления газовой смеси (например, из газового баллона) после откачки воздуха из банки, путем вытеснения атмосферы в шкафу или любыми другими подходящими способами (например, коммерчески доступными газовыми пакетами). В общем, для анаэробной инкубации требуется атмосфера с менее чем 1% объемной доли кислорода, от 9% объемной доли до 13% объемной доли углекислого газа.

**6.2 Аппарат для сухой стерилизации (печь) или влажной стерилизации (автоклав).**

**6.3 Инкубатор**, способный работать при температуре 37 °C ± 1 °C.

**6.4 pH-метр** с точностью калибровки ± 0,1 единицы pH при 25 °C.

**6.5 Холодильник**, способный работать при температуре 5 °C ± 3 °C.

**6.6 Стерильные бутылки, колбы или пробирки** соответствующей вместимости. Можно использовать бутылки, колбы или пробирки с нетоксичными металлическими или пластиковыми завинчивающимися крышками.

**6.7 Стерильные градуированные пипетки** или **автоматические пипетки** номинальной вместимостью 10 мл и 1 мл.

**6.8 Стерильные петли** объемом приблизительно 1 мкл, игла или проволока для инокуляции.

**6.9 Стерильные чашки Петри** диаметром около 90 мм и (произвольно) большого размера (диаметр около 140 мм).

**6.10 Водяная баня с термостатическим контролем**, способная работать при температуре от 44 °C до 47 °C и 80 °C ± 2 °C.

**7 Отбор проб**

Отбор проб не является частью метода, указанного в настоящем стандарте. Необходимо соблюдать конкретный международный стандарт, касающийся соответствующего продукта. Если нет конкретного международного стандарта, касающегося отбора проб соответствующего продукта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны пришли к соглашению по настоящему вопросу.

Рекомендуемые методы отбора проб приведены в следующих стандартах:

- ISO/TS 17728 для пищевых продуктов и кормов для животных;

- ISO 707 для молока и молочных продуктов;

- ISO 6887-3 для сырых моллюсков, оболочников и иглокожих из первичных производственных зон;

- ISO 13307 для первичной стадии производства;

- ISO 17604 для туш;

- ISO 18593 для поверхностей.

Важно, чтобы лаборатория получила образец, который является репрезентативным для рассматриваемого продукта. Образец не должен быть поврежден или изменен во время транспортировки или хранения.

**8 Подготовка образца для испытаний**

Подготовить образец для испытаний из лабораторной пробы в соответствии с конкретным международным стандартом, касающимся рассматриваемого продукта. Необходимо следовать процедурам, указанным в серии ISO 6887. Если нет конкретного международного стандарта, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны пришли к соглашению по настоящему вопросу.

**9 Процедура**

**9.1 Общие положения**

Схема порядка проведения приведена в Приложении A.

**9.2 Часть образца для анализа, исходная суспензия и разбавления**

Необходимо следовать процедурам в соответствии с серией ISO 6887 и конкретным международным стандартом, касающимся рассматриваемого продукта.

Подготовить одну серию десятичных разведений из части образца для анализа, если продукт жидкий, или из исходной суспензии в случае других продуктов.

Специальный протокол для приготовления исходной суспензии образцов корма приведен в Приложении D.

**9.3 Тепловая обработка для отбора спор**

Если предполагается подсчет только спор, нагревать серию десятичных разведений до 80 °C на водяной бане (6.10) в течение 10 мин ± 1 мин. Термическая обработка должна быть проведена в течение 15 мин после приготовления исходной суспензии, чтобы избежать прорастания спор. Если пробирка не помещена в водяную баню в течение 15 мин, ее следует немедленно поместить в тающий лед максимум на 2 ч.

Температуру во время тепловой обработки следует контролировать, помещая соответствующий термометр в эталонную бутылку того же размера, что и бутылка с образцом, и содержащую тот же объем воды при той же начальной температуре, что и обрабатываемый образец (6.6). Пробирки не должны быть герметично закрыты во время тепловой обработки. Время, необходимое для достижения 80 °C, не должно превышать 5 мин и может быть минимизировано, обеспечив уровень воды не менее чем на 4 см выше уровня образца и оснастив водяную баню циркуляционным водяным насосом для максимального теплообмена.

Необходимо начинать время нагрева (10 мин), когда температура эталонного образца достигнет 80 °C. После тепловой обработки образцы следует немедленно охладить примерно до 20 °C.

Термическая обработка также должна уменьшить конкурентную флору в некоторых матрицах, содержащих высокий уровень фоновой флоры (например, жидкая сыворотка, кормовой силос).

**9.4 Инокуляция и инкубация**

**9.4.1** Следует взять две стерильные чашки Петри диаметром примерно 90 мм (6.9). Перенести в каждую чашку с помощью стерильной пипетки (6.7) 1 мл исследуемого образца, если это жидкость, или 1 мл исходной суспензии (разведение 10-1) в случае других продуктов. Если посевы готовятся из более чем одного разведения, то можно сократить до одной чашки (см. ISO 7218).

Когда для определенных продуктов необходимо оценить низкое количество сульфитредуцирующих *Clostridium* spp., предел подсчета можно снизить в 10 раз, исследовав 10 мл исходной суспензии в трех больших (140 мм) чашках Петри (6.9).

**9.4.2** Следует взять еще одну стерильную чашку Петри (6.9). Использовать другую стерильную пипетку (6.7) для дозирования 1 мл разведения 10-1 (жидкий продукт) или 1 мл разведения 10-2 (другие продукты).

**9.4.3** При необходимости повторять процедуру с дальнейшими разведениями, используя новую стерильную пипетку (6.7) для каждого десятичного разведения.

**9.4.4** Если это уместно и возможно, выбрать только критические этапы разведения (не менее двух последовательных десятичных разведений) для инокуляции чашек Петри (6.9), которые дадут количество колоний от 10 до 150 колоний на чашку (на чашках Петри диаметром 90 мм) или от 10 до 360 колоний на чашку (на чашках Петри диаметром 140 мм).

**9.4.5** Необходимо налить в каждую чашку Петри (6.9) около 12 - 15 мл для чашек Петри диаметром 90 мм или 45 - 50 мл для чашек Петри диаметром 140 мм среды железосульфитного агара (ISA) (раздел B.2), расплавленной и нагретой до 44–47 °C (6.10).

**9.4.6** Тщательно перемешать инокулят со средой, вращая чашки Петри (6.9), и дать смеси затвердеть, оставив чашки Петри стоять на прохладной горизонтальной поверхности.

**9.4.7** После полного затвердевания налить около 5 мл среды ISA (раздел B.2) для чашек Петри диаметром 90 мм (6.9) или 10 мл для чашек Петри диаметром 140 мм (6.9) в качестве верхнего слоя, чтобы предотвратить развитие распространяющихся колоний на поверхности среды. Допустить затвердение в соответствии с указанием в 9.4.6.

**9.4.8** Перевернуть посевы в чашках, полученные в 9.4.7, и инкубировать посевы при 37 °C (6.3) в анаэробной атмосфере (6.1).

**9.5 Подсчет типовых колоний**

**9.5.1** Через 48 ч ± 2 ч инкубации проверить чашки с посевом (см. 9.4.8) на наличие предполагаемых сульфитредуцирующих *Clostridium* spp.

Подсчитать типовые колонии, которые показывают черное или серое или желто-коричневое окрашивание на среде ISA.

После извлечения чашек с посевом из анаэробной атмосферы чашки следует подсчитать в течение 30 мин, так как цвет колоний может быстро поблекнуть и исчезнуть под воздействием кислорода. Если используются анаэробные банки, чашки следует проверять по одной банке или небольшими порциями, если инкубация проводилась в анаэробном инкубаторе (6.1, 6.3).

ПРИМЕЧАНИЕ. Может возникнуть диффузное, неспецифическое почернение среды. Рост анаэробных бактерий, которые производят водород (не H2S), также может уменьшить присутствующий сульфит и привести к общему почернению среды, что затрудняет подсчет типовых колоний.

**9.5.2** Выбрать посевы (см. 9.5.1), содержащие менее 150 предполагаемых колоний (для чашек Петри диаметром 90 мм) или менее 360 колоний (для чашек Петри диаметром 140 мм). Подсчитать эти колонии и зарегистрировать их количество как предполагаемые колонии на чашку. Затем выбрать наугад пять таких колоний для субкультивирования для подтверждающих испытаний (см. 9.6).

Для подсчета чашек с посевом с низким или высоким числом предполагаемых колоний см. ISO 7218.

**9.6 Подтверждение сульфитредуцирующих *Clostridium* spp.**

**9.6.1** Для подтверждения следует взять пять предполагаемых колоний из каждой чашки, оставленной для подсчета (см. 9.5.2). Если среди колоний присутствует более одной морфологии, выбрать одну из каждой морфологии для субкультивирования и подтверждения.

**9.6.2** Нанести штрихами каждую из выбранных колоний стерильной петлей (6.8) на две чашки с неселективным кровяным агаром, например, колумбийским кровяным агаром (раздел B.3). Если крови нет, можно использовать основу колумбийского агара или другую богатую питательными веществами среду (например, триптон-соевый агар или агар с сердечно-мозговым экстрактом).

Допустить уравновешивание чашек при комнатной температуре, если они хранились при более низкой температуре. При необходимости высушить поверхность чашек перед использованием (см. ISO 11133).

Несколько изолятов можно нанести штрихами на определенные сектора каждой из двух неселективных агаровых чашек. Штрихи должны давать хорошо изолированные колонии.

Из каждой пары чашек одну инкубируют в аэробной атмосфере, а другую в анаэробной атмосфере (6.1) при температуре 37 °C в течение 20 ч ± 2 ч (6.3). После инкубации чашки можно охлаждать при температуре 5 °C (6.5) в течение максимум 48 ч перед считыванием. Для чашек, которые инкубировались в анаэробных условиях, необходимо поддерживать анаэробную атмосферу.

**9.6.3** Типовые колонии подтверждаются следующим образом:

- Если рост одной типовой колонии происходит на анаэробно инкубированной (кровяной) агаровой чашке и не происходит на аэробно инкубированной (кровяной) агаровой чашке, колония принадлежит к роду *Clostridia*. Настоящая колония и другие колонии с такой же морфологией на среде ISA считаются сульфитредуцирующими *Clostridium* spp.

- Если рост происходит на анаэробно и аэробно инкубированных чашках с кровяным агаром, колония не принадлежит к роду *Clostridia*. Следовательно, настоящая колония и другие колонии с такой же морфологией на среде ISA не могут считаться сульфитредуцирующими *Clostridium* spp.

ПРИМЕЧАНИЕ. Альтернативные процедуры (см. ISO 7218) могут использоваться для подтверждения того, что изолят является сульфитредуцирующим *Clostridium* spp., при условии, что пригодность альтернативной процедуры была подтверждена (см. ISO 16140-4 или ISO 16140-6).

**10 Представление результатов**

Для расчета результатов необходимо следовать процедурам в соответствии с ISO 7218. Рассчитать и представить отчет о результатах как количество сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. в КОЕ на грамм, на миллилитр или на квадратный сантиметр. Если площадь образца неизвестна, указать данные по устройству для отбора проб, такому как ткань, губчатый тампон или палочка.

Если использовалась тепловая обработка для отбора спор (9.3), результат сообщается как количество сульфитредуцирующих спор *Clostridium* spp. в КОЕ на грамм, на миллилитр, на квадратный сантиметр или на устройство для отбора проб.

В случаях, когда типовые колонии целевого организма не обнаружены, необходимо следовать положениям ISO 7218 для выражения результатов для особых случаев.

**11 Валидация метода**

**11.1 Межлабораторное исследование**

Результаты межлабораторного исследования (шаг 6 в ISO 17468) для определения характеристик эффективности метода описаны в 11.2.

ПРИМЕЧАНИЕ. В межлабораторном исследовании повторяемость и воспроизводимость были определены только на низком уровне, поскольку подсчет сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. выполняется в качестве гигиенического индикатора и на низких уровнях (например, максимально допустимые уровни для детской смеси составляют от 10 КОЕ/г до 30 КОЕ/г).

**11.2 Характеристики** **эффективности**

Характеристики эффективности метода (стандартные отклонения повторяемости и воспроизводимости) были определены в межлабораторном исследовании. Возможно, что значения, полученные в ходе межлабораторного исследования, не применимы к диапазонам концентраций и категориям (продуктов питания), отличным от тех, которые использовались в исследовании. Все данные приведены в Приложении C.

Сводка различных значений стандартного отклонения межлабораторной повторяемости (sr) приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Сводка значений sr из межлабораторного исследования

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Категория (пищевых продуктов) | Наименование (пищевых продуктов) | Значения sr низкого  уровня инокуляции |
| Готовые к употреблению, готовые к разогреву мясные продукты | Солонина | 0,091 |
| Многокомпонентные продукты питания или компоненты блюд | Суп быстрого приготовления | 0,049 |
| Детская смесь и детские каши | Порошковая детская смесь | 0,040 |
| Яйца и яичные продукты (производные) | Яичный порошок | 0,11 |
| Обработанные фрукты и овощи | Консервированный ананас | 0,060 |
| Образцы окружающей среды (производство продуктов питания или кормов) | Мазок окружающей среды | 0,054 |
| Корм для домашних животных и корм для животных | Кормовой силос | 0,048 |

Сводка различных значений стандартного отклонения межлабораторной воспроизводимости (*s*R) приведена в Таблице 2.

Таблица 2. Сводка значений *s*R из межлабораторного исследования

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Категория (продуктов питания) | Наименование (продуктов питания) | Значения *s*R низкого  уровня инокуляции |
| Готовые к употреблению, готовые к разогреву мясные продукты | Солонина | 0,93 |
| Многокомпонентные продукты питания или компоненты блюд | Быстрый суп | 0,41 |
| Детская смесь и детские каши | Порошковая детская смесь | 0,12 |
| Яйца и яичные продукты (производные) | Яичный порошок | 0,61 |
| Обработанные фрукты и овощи | Консервированные ананасы | 0,35 |
| Образцы окружающей среды (производство продуктов питания или кормов) | Мазок окружающей среды | 0,20 |
| Корм для домашних животных и корм для животных | Кормовой силос | 0,26 |

**12 Протокол испытаний**

В протоколе испытаний должно быть указано, как минимум, следующее:

- используемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт, т. е. ISO 15213-1;

- используемый метод отбора проб, если он известен;

- все рабочие условия, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные или информационные (включая информационные приложения), вместе с подробностями любых инцидентов, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

- любые отклонения от настоящего стандарта;

- вся информация, необходимая для полной идентификации образца;

- полученные результаты испытания;

- дата испытания;

- при необходимости или по запросу клиента оценка неопределенности измерений количественных результатов испытания в соответствии с ISO 19036:2019, раздел 9.

**13 Обеспечение качества**

Лаборатория должна иметь систему контроля качества, чтобы гарантировать, что оборудование, реактивы и методики подходят для метода. Использование положительных контролей, отрицательных контролей и холостых проб является частью метода. Испытание эффективности питательных сред указано в Приложении B и описано в ISO 11133.

**Приложение A**

*(обязательное)*

**Блок-схема процедуры**

На рисунке A.1 показана схема процесса подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. методом подсчета колоний в образцах пищевых продуктов, кормов для животных, окружающей среды и первичной стадии производства.

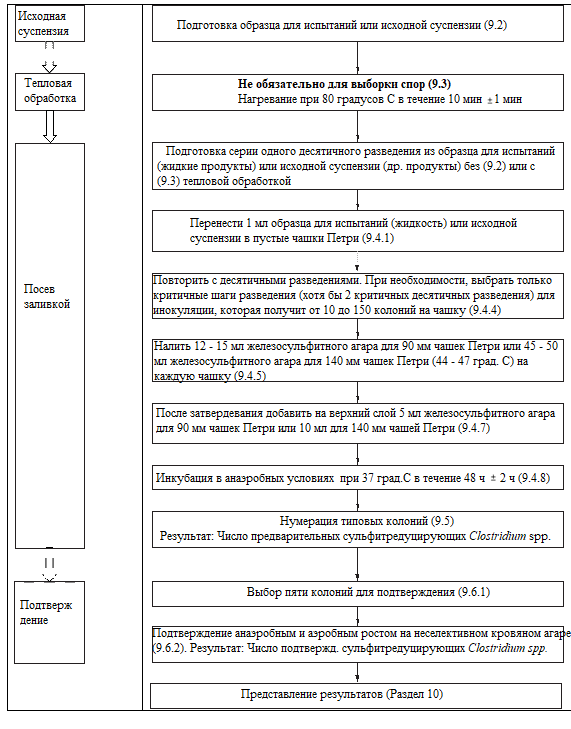


Рисунок А.1. Блок-схема процедуры подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. методом подсчета колоний

**Приложение B**

*(обязательное)*

**Питательные среды и реактивы**

**B.1 Общие положения**

Общие спецификации ISO 11133 применимы к подготовке и испытанию эффективности питательных сред, описанных в настоящем приложении. Если питательные среды или реактивы готовятся из обезвоженных полных сред/реактивов или если используются готовые к использованию среды/реактивы, необходимо следовать инструкциям производителя относительно подготовки, условий хранения, срока годности и использования.

Срок годности сред, указанных в настоящем приложении, был определен в некоторых исследованиях. Пользователь должен проверить это в собственных условиях хранения (в соответствии с ISO 11133).

Испытание эффективности питательных сред описано в разделе B.4.

**B.2 железосульфитный агар (ISA)**

**B.2.1 Состав**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Пептона |  | 15,0 г |
| Ферментативный перевар сои |  | 5,0 г |
| Дрожжевой экстракт |  | 5,0 г |
| Дисульфит натрия (метабисульфит натрия), безводный (Na2S2O5) | (Регистрационный номер CAS®d  7681-57-4) | 0,5 г |
| Железо (III) цитрат аммония (C6H8FeNO4) b | (Номер CAS 1185-57-5) | 1,0 г |
| Агарc |  | от 9,0 до 18,0 г |
| Вода |  | 1 000 мл |
| a Например, ферментативный продукт переваривания казеина.  b Настоящий реактив должен содержать не менее 150 г/кг железа.  c В зависимости от прочности геля агара.  d Chemical Abstracts Service (CAS) Register Number® является товарным знаком Американского химического общества (ACS). Настоящая информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не является одобрением ISO названного продукта. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет показано, что они приводят к тем же результатам. | | |

**B.2.2 Подготовка**

Растворить ингредиенты в воде, при необходимости нагревая.

При необходимости отрегулировать pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,6 ± 0,2 при 25 °C (6.4).

Стерилизовать в течение 15 минут в автоклаве (6.2), установленном на 121 °C.

Хранить среду при температуре 5 °C (6.5) до четырех недель в закрытых контейнерах или пробирках (6.6). Перед использованием хранимую среду полностью расплавить и охладить до 44 °C - 47 °C (6.10).

**B.3 Колумбийский кровяной агар (CBA)**

**B.3.1 Основа колумбийского кровяного агара**

**B.3.1.1 Состав**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ферментативный продукт переваривания животной ткани |  | 23,0 г |
| Крахмал растворимый (C12H22O11) | (CAS No. 9005-84-9) | 1,0 г |
| Хлорид натрия (NaCl) | (CAS No. 7647-14-5) | 5,0 г |
| Агара |  | от 8,0 до 18,0 г |
| Вода |  | 1 000 мл |
| a В зависимости от прочности геля агара. | | |

**B.3.1.2 Подготовка**

Растворить ингредиенты в воде, при необходимости нагревая.

При необходимости отрегулировать pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,3 ± 0,2 при 25 °C (6.4).

Разлить среду в колбы (6.6) подходящей емкости для получения порций, подходящих для испытания.

Стерилизовать в течение 15 мин в автоклаве (6.2), установленном на 121 °C. Хранить среду при 5 °C (6.5) до четырех недель в закрытых контейнерах или пробирках (6.6).

**B.3.2 Дефибрированная кровь (лошадиная или овечья кровь)**

**B.3.3 Полная основа**

**B.3.3.1 Состав**

|  |  |
| --- | --- |
| Основа (B.3.1) | 100 мл |
| Дефибрированная кровь (B.3.2) | 5 мл |

**B.3.3.2 Подготовка**

Добавить кровь к основе, предварительно охлажденной до 44 °C - 47 °C (6.10). Хорошо перемешать.

**B.3.3.3 Подготовка чашек с агаром из овечьей крови**

Разлить среду (B.3.3.1) в стерильные чашки Петри (6.9) порциями, соответствующими испытанию. Допустить затвердевание.

Непосредственно перед использованием высушить агаровые чашки, следуя процедуре, описанной в ISO 11133. Хранить чашки с посевами, защищенные для сушки, при температуре 5 °C (6,5) в течение четырех недель.

**B.4 Испытание эффективности**

Для определения селективности и эффективности следует обратиться к ISO 11133. В целом необходимо следовать процедурам испытания эффективности, описанным в ISO 11133.

Испытание эффективности для обеспечения качества питательных сред приведено в Таблице B.1.

**Таблица B.1. Испытание эффективности для обеспечения качества питательных сред**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Среда** | **Функция** | **Инкубация** | **Контроль**  **ные штаммы** | **Число**а  **WDCM** | **Справочная среда** | **Метод контроля** | **Критерии**c,e |
| ISA | Эффективность | (48 ± 2) h/  (37 ± 1) °C  анаэробная атмосфера | *Clostridium perfringens* | 00007b  00080 | Подходящая неселективная среда для анаэробов | Количественный | *P*R ≥ 0,5  (*P*R ≥ 0,7 по сравнению с партией ISA, уже  проверенной) |
| Специфичность | *Escherichia coli*d | 00013 или  00012 | — | Качественный | Рост  (от 1 до 2)  Отсутствие почернения колоний |
| CBA | Подтверждение | (20 ± 2) h /  (37 ± 1) °C  анаэробная атмосфера | *Clostridium perfringens* | 00007b | — | Качественный | Хороший рост (2)  Колонии с бета-гемолизом |
| a См. каталог справочных штаммов на [http://www.wfcc.info](http://www.wfcc.info/) для получения информации о числе штаммов коллекции культур и контактных данных; WDCM: Всемирный центр данных по микроорганизмам.  b Штамм, который следует использовать как минимум.  c *P*R = коэффициент эффективности.  d Штамм без выбора; один из штаммов должен использоваться как минимум.  e Рост классифицируется как 0: отсутствие роста; 1: слабый рост (частичное ингибирование); 2: хороший рост (см. ISO 11133). | | | | | | | |

**Приложение C**

*(информационное)*

**Характеристики эффективности метода**

Было проведено межлабораторное исследование с участием 20 лабораторий в 7 странах. В исследование были включены следующие (пищевые продукты) наименования [представляющие указанные категории (пищевых продуктов): консервированная солонина, суп быстрого приготовления, сухая детская смесь, яичный порошок, консервированный ананас, мазки для взятия проб из окружающей среды и кормовой силос. Каждый (пищевой продукт) образец был испытан при низком уровне загрязнения. Исследование было организовано в 2019 году справочником Мерка KGaA, Дармштадт, Германия и FrieslandCampina (Нидерланды) в рамках разработки настоящего стандарта.

Значения характеристик эффективности для каждого (пищевого) наименования и категории, полученные в ходе настоящего межлабораторного исследования, показаны в таблицах C.1 - C.7 и были рассчитаны в соответствии с ISO 17468.

Таблица C.1. Результаты анализа данных, полученных с консервированной солониной (категория: готовые к употреблению, готовые к разогреву мясные продукты)

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 13 |
| Количество проб | 26 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 26 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,61 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,091 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,931 |
| ПРИМЕЧАНИЕ 1. Штамм, использованный для инокуляции: *C. perfringens* (WDCM 00201).  ПРИМЕЧАНИЕ 2. Полученное значение *sR* высокое из-за больших различий, обнаруженных разными участниками для консервированной солонины. | |

Таблица C.2. Результаты анализа данных, полученных с супом быстрого приготовления (категория: многокомпонентные продукты питания или компоненты еды)

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 13 |
| Количество проб | 26 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 26 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,58 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,049 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,41 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. perfringens* (WDCM 00201). | |

Таблица C.3. Результаты анализа данных, полученных с использованием сухой детской смеси (категория: детская смесь и детские каши)

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 8 |
| Количество проб | 16 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 16 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,48 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,040 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,12 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. sporogenes* (WDCM 00008). | |

Таблица C.4. Результаты анализа данных, полученных с яичным порошком (категория: яйца и яичные продукты (производные))

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 7 |
| Количество проб | 14 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 14 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,52 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,11 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,61 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. sporogenes (*WDCM 00008). | |

Таблица C.5. Результаты анализа данных, полученных с консервированным ананасом (категория: обработанные фрукты и овощи)

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 13 |
| Количество проб | 26 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 26 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,60 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,060 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,35 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. bifermentans* (WDCM 00079). | |

Таблица C.6. Результаты анализа данных, полученных с помощью мазка из окружающей среды (категория: образцы окружающей среды (производство продуктов питания или кормов))

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 14 |
| Количество проб | 28 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 28 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,60 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,054 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,20 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. bifermentans (*WDCM 00079). | |

Таблица C.7. Результаты анализа данных, полученных с кормовым силосом (категория: корм для домашних животных и корм для животных)

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Низкий уровень** |
| Количество участвующих сотрудников | 20 |
| Количество сотрудников, оставшихся после оценки данных | 13 |
| Количество проб | 26 |
| Количество результатов проб, оставшихся после оценки данных | 26 |
| Среднее значение Σa (log10 КОЕ/г) | 0,61 |
| Стандартное отклонение межлабораторной повторяемости, *sr* (log10 КОЕ/г) | 0,048 |
| Стандартное отклонение межлабораторной воспроизводимости, *sR* (log10 КОЕ/г) | 0,26 |
| ПРИМЕЧАНИЕ. Штамм, использованный для инокуляции: *C. perfringens* (WDCM 00201). | |

**Приложение D**

*(информационное)*

**Специальный протокол для подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. в кормах**

**D.1 Общие положения**

В настоящем приложении описывается специальный протокол [11] для приготовления исходной суспензии корма для подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. Корм может содержать добавки, такие как медь, которые могут повлиять на результаты подсчета. Настоящую проблему можно решить, используя специальный разбавитель и различные соотношения для приготовления исходной суспензии.

Испытание эффективности разбавителей описано в разделе D.6.

**D.2 Принцип**

Гомогенная исходная суспензия готовится из образца с буферным раствором, содержащим полиоксиэтилен-80-сорбитанмонолаурат (PSM) и пептон. В случаях, когда в образце есть критические количества меди, во время приготовления исходной суспензии необходимо добавить хелатирующий агент.

**D.3 Питательные среды и реактивы**

Общие спецификации ISO 11133 применимы к подготовке и испытанию эффективности питательных сред, описанных в настоящем приложении. Если питательные среды или реактивы готовятся из обезвоженных полных сред/реактивов или если используются готовые к использованию среды/реактивы, необходимо следовать инструкциям производителя относительно подготовки, условий хранения, срока годности и использования.

Срок годности сред, указанных в настоящем приложении, был определен в некоторых исследованиях. Пользователь должен проверить их в собственных условиях хранения (как указано в соответствии с ISO 11133).

**D.3.1 Исходный раствор разбавителя корма**

**D.3.1.1 Состав**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ферментативный продукт переваривания животных тканей |  | 1,0 г |
| Дигидрат дигидрофосфата натрия (NaH2PO4 · 2 H2O) | (CAS № 13472-35-0) | 0,58 г |
| Динатрия гидрофосфата дигидрат (Na2HPO4 · 2 H2O) | (CAS № 7558-79-4) | 2,5 г |
| Хлорид натрия (NaCl) |  | 4,0 г |
| Полиоксиэтилен-80-сорбитанмонолаурат(C46H52N5O8P) | (CAS № 9005-65-6) | 0,3 г |
| Вода |  | 1 000 мл |

**D.3.1.2 Подготовка**

Растворить компоненты в воде, при необходимости нагревая.

При необходимости отрегулировать pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 ± 0,2 при 25 °C (6.4).

Стерилизовать в течение 15 мин в автоклаве (6.2), установленном на 121 °C.

Хранить среду в закрытых контейнерах (6.6) при температуре 5 °C (6.5) до четырех недель.

**D.3.2 Раствор разбавителя корма**

**D.3.2.1 Состав**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Дигидрат дигидрофосфата натрия (NaH2PO4 · 2 H2O) | (CAS № 13472-35-0) | 0,58 г |
| Динатрия гидрофосфата дигидрат (Na2HPO4 · 2 H2O) | (CAS № 7558-79-4) | 2,5 г |
| Хлорид натрия (NaCl) |  | 4,0 г |
| Вода |  | 1 000 мл |

**D.3.2.2 Подготовка**

Растворить компоненты в воде, при необходимости нагревая.

При необходимости отрегулировать pH так, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 ± 0,2 при 25 °C (6.4).

Стерилизовать в течение 15 мин в автоклаве (6.2) установленном на температуру 121 °C.

Хранить среду в закрытых контейнерах (6.6) при температуре 5 °C (6.5) до четырех недель.

**D.3.3 Полиоксиэтилен-80-сорбитанмонолаурат (PSM) (CAS № 9005-65-6)**

**D.4 Оборудование и расходные материалы**

Одноразовое оборудование является приемлемой альтернативой многоразовой стеклянной посуде, если оно имеет подходящие характеристики. Следует использовать обычное микробиологическое лабораторное оборудование (см. ISO 7218) и, в частности, следующее.

**D.4.1 Стерильные контейнеры для хранения** исходного раствора разбавителя корма (D.3.1) и раствора разбавителя корма (D.3.2), например, колбы или бутылки для хранения с номинальным объемом 500 мл, 1 000 мл или 2 500 мл и соответствующие крышки или пробки.

**D.4.2 Стерильные лабораторные бутылки** с номинальным объемом 500 мл и 1 000 мл с резьбой по стандарту или крышками.

**D.4.3 Стерильные бутылки или колбы** емкостью не менее 50 мл и соответствующие крышки или пробки.

**D.4.4 Устройство для встряхивания**, предпочтительно горизонтальный шейкер, который можно установить на 120 об/мин - 180 об/мин.

**D.4.5 Лопастной блендер** со стерильными пакетами (минимальная емкость 400 мл).

**D.4.6 Стерильные градуированные серологические пипетки** (5 мл) для полного слива с широкими наконечниками.

**D.5 Порядок проведения**

**D.5.1 Часть образца для анализа и приготовление исходной суспензии**

Рекомендуемые объемы пробы и соответствующие объемы исходного разбавителя корма (D.3.1) описаны в Таблице D.1, Часть A. Обработать исходную суспензию с помощью рекомендуемой процедуры, показанной в Таблице D.1, Часть B.

Таблица D.1. Рекомендуемые количества образца, соответствующие объемы исходного раствора разбавителя корма и порядок проведения

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Часть A  Рекомендуемые количества пробы и объемы готового к использованию исходного раствора разбавителя корма для приготовления исходных суспензий образцов для различных типов образцов | | | | Часть B  Результирующий коэффициент разбавления и  рекомендуемая обработка исходных суспензий | |
| Тип пробы | Критическое содержание меди  мг/кг | Количество пробы  г или мл | Исходный разбавитель корма (D.3.1)  мл | Коэффициент разбавления исходной  суспензии | Обработка исходной  суспензии |
| Добавки | Неприменимо | 4 | 196 | 1:50 | Устройство для встряхивания (20 мин) или лопастной блендер  (5 мин) |
| Предваритель  ные смеси, минеральные корма | ≥ 400 | 20 | 380 | 1:20 |
| Сильно  набухающие корма | ≥ 400 | 380 |
| Сено, солома и силос | Неприменимо | 20 | 380 | 1:20 |
| Разовый корм | Неприменимо | 20 | 180 | 1:10 |
| Заменитель молока | Неприменимо |
| Комбикорм | ≥ 200 |
| Жидкий корм | Неприменимо | 20 | 180 | 1:10 |
| Пастообразный и маслянистый корм | ≥ 400 | 5 | 90 + 5 г ПСМ | 1:20 | Лопаточный блендер  (5 мин) |

**D.5.2 Процедура встряхивания**

Взвесить рекомендуемое количество пробы (см. Таблицу D.1, Часть A) в бутылке (D.4.2). Добавить исходный раствор разбавителя корма (D.3.1) и немедленно энергично встряхнуть смесь вручную в течение примерно 1 мин. Обработать исходную суспензию в течение 20 мин на встряхивающем устройстве (D.4.4).

**D.5.3 Метод лопастного блендера**

Взвесить рекомендуемое количество образца (см. Таблицу D.1, Часть A) и, при необходимости, PSM в мешок лопастного блендера (D.4.5). Добавить исходный раствор разбавителя корма (D.3.1) и гомогенизировать смесь в лопастном блендере (D.4.5) в течение 5 мин.

**D.5.4 Первое разбавление**

Приготовить первое разбавление (получив коэффициент разбавления 1:100) с использованием раствора разбавителя корма (D.3.2) в соответствии с Таблицей D.2 из обработанной исходной суспензии (D.5.2 или D.5.3). Сохранять исходную суспензию однородной для отмеривания пипеткой. Перенести необходимый объем исходной суспензии (D.5.2 или D.5.3) в контейнеры (D.4.2) с помощью пипетки (D.4.6).

Таблица D.2. Рекомендуемые объемы для приготовления первых разведений

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тип образца | Добавки | Предварительные смеси, минеральные корма, сильно набухающие, маслянистые или пастообразные корма, силос, сено, солома | Другие твердые и жидкие корма |
| Обработанная исходная суспензия | D.5.2 или D.5.3 | | |
| Коэффициент разбавления исходной суспензии | 1:50 | 1:20 | 1:10 |
| Объем исходной суспензии  (D.5.2 или D.5.3) | 5 мл | 5 мл | 5 мл |
| + Раствор разбавителя корма (D.3.2) | + 5 мл | + 20 мл | + 45 мл |
| Коэффициент разбавления первого разбавления  (D.5.2 или D.5.3) | 1:100 (от 10 до 2) | | |

Из первого разбавления дальнейшие серийные разбавления выполняются в соответствии с D.5.4 с использованием стерильных бутылок или колб (D.4.3). Следующие шаги для подсчета сульфитредуцирующих *Clostridium* spp. выполняются в соответствии с процедурой, описанной в основном тексте настоящего стандарта (начиная с 9.3).

**D.6 Испытание эффективности**

Для определения селективности и эффективности см. ISO 11133. В целом, необходимо следовать порядку проведения испытания эффективности, описанному в ISO 11133.

Испытание эффективности для обеспечения качества разбавителя корма приведено в Таблице D.3.

Таблица D.3. Испытание эффективности для обеспечения качества разбавителей корма

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Среда | Функция | Инкуба-ция | Контроль-ные штаммы | Числоа WDCM | Метод контроля | Критерии |
| Исходный раствор разбавителя корма, раствор разбавителя корма | Разбавитель | от 45 мин до 1 ч/  от 20 °C до 25 °C | *Clostridium perfringens* | 00007b | Количествен-ный | ±30 % колоний / до (±30 % от исходного количества) на подходящей  неселективной среде для  анаэробов |
| a См. каталог эталонных штаммов на <http://www.wfcc.info> для получения информации о номерах штаммов для сбора культур и контактных данных; WDCM: Всемирный центр данных по микроорганизмам.  b Штамм, который следует использовать как минимум. | | | | | | |

**Приложение ДА**

(справочное)

**Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам**

Таблица ДА.1 – Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным межгосударственным стандартам

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Обозначение ссылочного международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта |
| ISO 6887 (все части) | IDT | ГОСТ ISO 6887-1-2019 Микробиология пищевой цепи. Подготовка образцов для испытаний, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятикратных разведений  ГОСТ ISO 6887-2-2017 Микробиология пищевой цепи Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований Часть 2 Специальные правила подготовки мяса и мясной продукции  ГОСТ ISO 6887-5-2016 Микробиология пищевой продукции и кормов. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологического исследования. Часть 5. Специальные правила подготовки молока и молочной продукции  ГОСТ ISO 6887-6-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб для анализа, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологического исследования. Часть 6. Специальные правила приготовления проб, отобранных на начальной стадии производства |
| ISO 7218 | IDT | ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям |
| ISO 11133 | IDT | ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и проверка рабочих характеристик питательных сред. |
| ISO 19036:2019 | - | \* |
| \* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.  Примечание – В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:  - IDT – идентичные стандарты. | | |

**Библиография**

[1] ISO 707, Milk and milk products — Guidance on sampling (Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб).

[2] ISO 13307, Microbiology of food and animal feed — Primary production stage — Sampling techniques (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Начальная стадия производства. Методы отбора проб).

[3] ISO 15213-2, Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 2: Enumeration of Clostridium perfringens by colony-count technique (Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Clostridium spp. Часть 2. Подсчет бактерий Clostridium perfringens методом подсчета колоний).

[4] ISO/TS 15213-3, Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 3: Detection of Clostridium perfringens (Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения и подсчета бактерий Clostridium spp. Часть 3. Обнаружение бактерий Clostridium perfringens).

[5] ISO 16140-4, Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory (Микробиология пищевой цепи. Валидация методов. Часть 4. Протокол валидации метода в одной лаборатории).

[6] ISO 16140-6, Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (Микробиология пищевой цепи. Валидация методов. Часть 6. Протокол валидации альтернативных (патентованных) методов для процедур микробиологического подтверждения и типирования).

[7] ISO 17468, Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method (Микробиология пищевой цепи. Технические требования и руководство по разработке и пересмотру стандартизованного эталонного метода).

[8] ISO 17604, Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis (Микробиология пищевой цепи. Отбор проб с туши для микробиологического анализа).

[9] ISO/TS 17728, Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples (Микробиология пищевой цепи. Методы отбора проб пищевой продукции и кормов для микробиологического анализа).

[10] ISO 18593, Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface sampling (Микробиология пищевой цепи. Горизонтальные методы отбора проб с поверхностей).

[11] VDLUFA 28.3.2, Futtermitteluntersuchung – Bestimmung von Sulfitreduzierenden Clostridien (Анализ кормов. Определение сульфитредуцирующих клостридий).

|  |  |
| --- | --- |
| МКС   07.100.30 | IDT |
| **Ключевые слова:** микробиология пищевой цепи, горизонтальный метод, бактерии clostridium spp., подсчет сульфитредуцирующих бактерий clostridium spp., метод подсчета колоний. | |

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Руководитель**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД А. Сопбеков**

**Заместитель Руководителя**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД Е. Ялынская**

**Ведущий специалист**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД Н. Жакиш**