

GOST R 52816-2007

Asiakirja:

Nimitys:

Nimitys englanniksi:

Soveltamisala:

GOST R 52816-2007

Elintarvikkeet. Kolibakteerien (koliformisten bakteerien) toteamis- ja laskentamenetelmät

Food products. Methods for detection and quantity determination of coliformes

GOST R 52816-2007

VENÄJÄN FEDERAATION
TEKNISEN SÄÄNTELYN JA METROLOGIAN VIRASTO

VENÄJÄN
FEDERAATION
KANSALLINEN
STANDARDI

**GOST R
52816-
2007**

ELINTARVIKKEET

Kolibakteerien (koliformisten bakteerien) toteamis- ja laskentamenetelmät

Virallinen julkaisu

Moskova
Standartinform
2008

GOST R 52816-2007

Alkusanat

Standardoinnin tavoitteet ja periaatteet Venäjällä on säädetty 27. joulukuuta 2002 teknisestä sääntelystä annetulla Venäjän federaation lailla nro 184-FZ ja Venäjän kansallisten standardien soveltamissäännöt Venäjän valtion standardilla GOST R 1.0–2004 "Standardointi Venäjän federaatiossa. Keskeiset säännökset".

Tietoja standardista

- 1 KEHITETTY Venäjän säilyke- ja vihannesten kuivausteollisuuden tiede- ja tutkimuslaitoksessa (GNU VNIKOP) kohdassa 4 mainittujen standardien autenttisten käännösten nojalla
- 2 Teknisen standardointikomitean ESITTÄMÄ (TK 93 "Hedelmien, vihannesten ja sienten jalostustuotteet")
- 3 HYVÄKSYTTY JA SAATETTU VOIMAAN Venäjän federaation teknisen sääntelyn ja metrologian viraston 27. joulukuuta 2007 antamalla määräyksellä nro 443-st
- 4 Tämä standardi on seuraavien kansainvälisten standardien muunnelma:

□ ISO 4831:2006 "Elintarvikkeiden ja eläinten ruokien mikrobiologia. Horisontaalinen menetelmä koliformien toteamiseksi ja laskemiseksi. Todennäköisimmän luvun menetelmä" (ISO 4831:2006 "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique", MOD);

□ ISO 4832:2006 "Elintarvikkeiden ja eläinten ruokien mikrobiologia. Koliformien horisontaalinen laskentamenetelmä. Pesäkkeiden laskentamenetelmä" (ISO 4832:2006 "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique", MOD) elintarvikkeiden suhteen.

Tällöin standardin tekstiin Venäjän kansallisen talouden tarpeiden ja venäläisen standardoinnin erityispiirteiden huomioimiseksi sisällytetyt täydentävät säännökset ja vaatimukset on kursivoitu.

Tämän standardin ja mainittujen kansainvälisten standardien rakenteiden vertailu on esitetty liitteessä B.

Tämän standardin nimitystä on muutettu em. kansainvälisen standardin nimitykseen nähden sen yhdenmukaistamiseksi GOST R 1.5–2004 (alaluku 3.5) -standardiin.

Tätä standardia sovellettaessa on suositeltavaa käyttää tietoja kansainvälisten viitestandardien vastaavuudesta suhteessa liitteessä C mainittuihin ja tässä standardissa viitenormeina käytettyihin Venäjän kansallisiin standardeihin.

5 SAATETTU VOIMAAN ENSI KERTAA

Tietoja tämän standardin muutoksista julkaistaan vuosittaisessa Kansalliset standardit -muistiossa ja muutosten ja korjausten tekstit kuukausittaisissa Kansalliset standardit -muistioissa. Mikäli tämä standardi tarkistetaan/vaihdetaan tai kumotaan, asiasta ilmoitetaan kuukausittaisessa Kansalliset standardit -muistiossa. Asianmukaiset tiedot, ilmoitukset ja tekstit julkaistaan myös yleiskäyttöön tarkoitettussa tietojärjestelmässä Venäjän federaation teknisen sääntelyn ja metrologian viraston virallisella internet-sivustolla.

© Standartinform, 2008

Tätä standardia ei saa täysin tai osittain jäljentää, monistaa tai jaella virallisena julkaisuna ilman Venäjän federaation teknisen sääntelyn ja metrologian viraston lupaa.

GOST R 52816-2007**Sisältö**

1	Soveltamisala	1
2	Viitenormit	1
3	Termit ja määritelmät	2
4	Koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen todennäköisimmän luvun menetelmän mukaan	2
4.1	Koliformisten bakteerien toteamismenetelmä	2
4.2	Todennäköisimmän luvun menetelmä — koliformisten bakteerien laskenta	2
5	Koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen — pesäkelaskenta	3
5.1	Viljelymenetelmä selektiivi-diagnostiseen agar-liemeen	3
5.2	Viljelymenetelmä selektiivi-diagnostiselle agar-alustalle	3
6	Ravintoalustat, -liemet ja reagenssit	3
7	Laitteet, astiat, tarvikkeet ja reagenssit	7
8	Näytteiden otto ja valmistelu	8
9	Testaus	8
10	Lisävarmennus siitä, että todetut bakteerit ovat koliformisia bakteereja	11
11	Testauspöytäkirja	12
Liite A	(ohjeellinen) Koliformisten bakteerien toteamiskaavio	13
Liite B	(ohjeellinen) Tämän standardin ja siihen sovellettujen kansainvälisten standardien rakenteiden vertailu	14
Liite C	(ohjeellinen) Tietoja kansainvälisten viitestandardien vastaavuudesta suhteessa liitteessä C mainittuihin ja tässä standardissa viitenormeina käytettyihin Venäjän kansallisiin standardeihin	16

GOST R 52816-2007

VENÄJÄN FEDERAATION KANSALLINEN STANDARDI

ELINTARVIKKEET

**Kolibakteerien
(koliformisten bakteerien) toteamis- ja laskentamenetelmät**

Food products. Methods for detection and quantity determination of coliformes

Voimaantulopäivä 1.1.2009

1 Soveltamisala

Tämä standardi kattaa elintarvikkeet maitoa ja maitotuotteita lukuun ottamatta ja säätää koliformisten bakteerien toteamismenetelmän tietyistä elintarvikkeen ainemäärästä ja kolme niiden laskentamenetelmää; todennäköisimmän luvun menetelmän ja viljelymenetelmät selektiivi-diagnostisiin agar-liemiin tai *selektiivi-diagnostisille agar-alustoille*.

Todennäköisimmän luvun menetelmää koliformisten bakteerien laskemiseksi sovelletaan elintarvikkeisiin, jotka sisältävät 1 g:ssä kovaa näytettä alle 150 tai 1 cm:ssä³ nestemäistä näytettä alle 15 koliformisten bakteerien solua.

Koliformisten bakteerien laskentamenetelmä viljelemällä selektiivi-diagnostisiin agar-liemiin on tarkoitettu elintarvikkeille, jotka sisältävät 1 g:ssä kovaa tuotetta yli 150 tai 1 cm:ssä³ nestemäistä tuotetta yli 15 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä (pmy) koliformisia bakteereja.

Koliformisten bakteerien laskentamenetelmä viljelemällä selektiivi-diagnostisille agar-alustoille on tarkoitettu elintarvikkeille, jotka sisältävät 1 g:ssä kovaa tuotetta yli 1500 tai 1 cm:ssä³ nestemäistä tuotetta yli 150 pmy:ä koliformisia bakteereja.

2 Viitenormit

Tässä standardissa käytetään viitenormeina seuraavia standardeja:

GOST R 51446–99 (ISO 7218–96) *Mikrobiologia. Elintarvikkeet. Mikrobiologisten tutkimusten yleissäännöt*

GOST 9284–75 *Objekttilasit mikrovalmisteita varten. Tekniset ehdot*

GOST 10444.1–84 *Säilykkeet. Mikrobiologisessa analyysissä käytettävien reagenssiliuosten, värien, indikaattorien ja ravintoalustojen/-lienten valmistaminen*

GOST 24104–2001 *Laboratoriovaa'at. Yleiset tekniset vaatimukset*

GOST 25336–82 *Laboratorioiden lasiastiat ja -tarvikkeet. Tyypit, perusparametrit ja mitat*

GOST 26668–85 *Elintarvikkeet ja makuaineet. Näytteenottomenetelmät mikrobiologisia analyyseja varten*

GOST 26665–95 *Elintarvikkeet ja makuaineet. Näytteiden valmistaminen mikrobiologisia analyyseja varten*

GOST 26670–91 *Elintarvikkeet. Pieneliöiden viljelymenetelmät*

GOST 29184–91 *Elintarvikkeet. Enterobacteriaceae-heimon bakteerien toteamis- ja laskentamenetelmät*

GOST 30425–97 *Säilykkeet. Teollisen steriiliyden toteamismenetelmät*

Virallinen julkaisu

GOST R 52816-2007

Huomautus. Tätä standardia käytettäessä on tarkoituksenmukaista tarkastaa viitestandardien voimassaolo Venäjän federaation teknisen sääntelyn ja metrologian viraston kotisivustolla olevassa yleiskäyttöön tarkoitettuun tietojärjestelmässä tai vuosittaisessa ko. vuoden 1. tammikuuta ajankohtaisessa Kansalliset standardit -muistiossa ja asianmukaisissa ko. vuonna julkaistuissa kuukausittaisissa muistioissa. Mikäli viitestandardi on vaihdettu/muutettu, tätä standardia käytettäessä on noudatettava korvaavaa/muutettua standardia. Mikäli viitestandardi on kumottu ilman muuttamista, säännöstä, jossa siihen viitataan, sovelletaan siltä osin kuin se ei koske ko. viitettä.

3 Termit ja määritelmät

Tässä standardissa on käytetty seuraavia termejä määritelmineen:

3.1 koliformiset bakteerit: Bakteerit, jotka 37 °C:n lämpötilassa fermentoivat laktoosia ja muodostavat kaasua sillä tavalla, kuin on kerrottu tässä standardissa.

3.2 koliformisten bakteerien toteaminen: Koliformisten bakteerien esiintymisen tai esiintymättömyyden määrittäminen tuotteen tietyssä massassa tai volyymissä tämän standardin mukaisesti.

3.3 koliformisten bakteerien laskenta:

3.3.1 Näytteen 1 cm:ssä³ tai 1 g:ssä oleva bakteerien lukumäärä, joka on määritetty viljelemällä näytettä ja/tai sen laimennoksia selektiivi-diagnostiseen agar-liemeen tai selektiivi-diagnostiselle agar-alustalle, laskemalla 37 °C:n lämpötilassa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen tyyppiset ja atyyppiset pesäkkeet sekä toteamalla näiden pesäkkeiden bakteerien laktoosin fermentaatiokyvyn ja kaasunmuodostuksen tässä standardissa esitettyjen menetelmien mukaan.

Tarvittaessa todistetaan biokemiallisten ominaisuuksien mukaan, että valitut pesäkkeet ovat koliformisia bakteereja.

3.3.2 Näytteen 1 cm:n³ tai 1 g:n sisältämä bakteerien lukumäärä, joka on määritetty tässä standardissa mainitun todennäköisimmän luvun menetelmän mukaan.

4 Koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen todennäköisimmän luvun menetelmän mukaan

Menetelmien kuvaus

Koliformisten bakteerien todennäköisimmän luvun toteamis- ja laskentamenetelmät perustuvat näytteen tietyn määrän ja/tai näytteen ainemäärän laimennosten viljelyyn laktoosia sisältävään selektiiviseen liemeen, viljelmien inkubointiin, positiivista tulosta sisältävien koeputkien huomiointiin, viljelynesteen uudelleenviljelyyn selektiiviseen liemeen kaasunmuodostuksen määrittämiseksi tai tarvittaessa viljelynesteen uudelleenviljelyyn selektiivi-diagnostiselle alustalle sen todistamiseksi biokemiallisten ja kulturaalisten ominaisuuksien mukaan, että valitut pesäkkeet ovat koliformisia bakteereja.

4.1 Koliformisten bakteerien toteamismenetelmä

4.1.1 Selektiivistä rikastusalustaa sisältävä koeputki inokuloidaan näytteellä tai näytteen ainemäärän laimennoksella ja inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa 24 tai 48 tuntia.

4.1.2 Varmistusalustaa sisältävä koeputki inokuloidaan kohdan 4.1.1 mukaan saadusta koeputkesta, jossa on todettu kaasunmuodostusta ja/tai sameutta ja inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa 24 tai 48 tuntia.

4.1.3 Koliformisten bakteerien esiintymistä pidetään todistettuna, jos kohdan 4.1.2 mukaan saatua koeputkea tarkastettaessa on todettu sameutta ja kaasunmuodostusta.

4.2 Todennäköisimmän luvun menetelmä — koliformisten bakteerien laskenta

4.2.1 Kolme kaksinkertaisesti väkevöityä selektiivistä rikastuslientä sisältävää koeputkea inokuloidaan tietyllä määrällä näytettä, jos lähtönäyte on nestemäistä tai tietyllä määrällä alkususpensiota, jos näyte on muuta.

4.2.2 Kolme normaalia selektiivistä rikastuslientä sisältävää koeputkea inokuloidaan tietyllä määrällä näytettä ja/tai näytteen laimennoksella, jos lähtönäyte on nestemäistä tai tietyllä määrällä alkususpensiota ja/tai laimennosta, jos näyte on muuta.

4.2.3 Kaksinkertaisesti väkevöityä rikastuslientä sisältävissä koeputkissa olevia viljelmiä inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa 24 tuntia. Normaalia kasvualustaa sisältävissä koeputkissa olevia viljelmiä inkuboidaan 24 tai 48 tuntia. Sen jälkeen koeputkissa todetaan kaasua ja/tai kaasunmuodostuksen toteamista estävää sameutta.

GOST R 52816-2007

4.2.4 Varmistusalustaa sisältävät koeputket inokuloidaan viljelmillä kaksinkertaisesti väkevöityä selektiivistä rikastuslientä ja normaalia selektiivistä rikastuslientä sisältävistä koeputkista, joissa on todettu kaasunmuodostusta ja/tai sameutta.

Varmistusalustaa sisältävissä koeputkissa olevia viljelmiä inkuboidaan 37 °C:n lämpötilassa 24 tai 48 tuntia. Sen jälkeen koeputkissa todetaan kaasunmuodostusta.

4.2.5 Koliformisten bakteerien todennäköisin luku 1 cm:ssä³ tai 1 g:ssa näytettä lasketaan ottaen huomioon varmistusalustaa sisältävät koeputket (ks. 4.2.4), joissa on todettu kaasunmuodostusta. Todennäköisimmän luvun määrittämiseksi käytetään taulukkoa standardista GOST 26670.

5 Koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen menetelmät — pesäkelaskenta

Menetelmien kuvaus

Koliformisten bakteerien lukumäärän määrittämismenetelmät viljelemällä selektiivi-diagnostisiin agar-liemiin *tai selektiivi-diagnostisille agar-alustoille* perustuvat näytteiden tai niiden laimennosten tietyn määrän viljelyyn laktoosia sisältävään selektiivi-diagnostiseen agar-liemeen tai laktoosia sisältävälle selektiivi-diagnostiselle agar-alustalle, viljelmien inkubointiin, tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden laskentaan, tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden uudelleenviljelyyn laktoosia sisältävään selektiiviseen liemeen kaasunmuodostuksen määrittämiseksi ja *tarvittaessa sen todistamiseksi biokemiallisten ominaisuuksien mukaan, että valitut pesäkkeet ovat koliformisia bakteereja.*

5.1 Viljelymenetelmä selektiivi-diagnostiseen agar-liemeen

5.1.1 Koliformisten bakteerien lukumäärän määrittämiseksi 1 cm:ssä³ nestemäisestä näytteestä tai 1 cm:ssä³ muun näytteen alkulaimennoksesta näytettä laitetaan kahteen steriiliin petrimaljaan.

Toista maljaparia käytetään muita määriä varten kuten alkususpensio ja/tai näytteen kymmenenkertaiset laimennokset.

Näytettä tai sen laimennosta sisältäviin maljoihin lisätään ravitsevaa agar-lientä.

Viljelmiä inkuboidaan maljoissa 24 tuntia 37 °C:n lämpötilassa.

5.1.2 *Tyyppiset ja atyyppiset pesäkkeet lasketaan ja määritetään tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden bakteerien laktoosin fermentaatiokyky.*

5.1.3 Pesäkkeiden lukumäärä 1 cm:ssä³ tai 1 g:ssa näytettä lasketaan (Venäjän valtionstandardin) GOST 26670 mukaan ottaen huomioon maljoissa kasvaneiden todistettujen tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden lukumäärät.

5.2 Viljelymenetelmä selektiivi-diagnostiselle agar-alustalle

5.2.1 *Kahdessa petrimaljassa olevan selektiivi-diagnostisen agar-alustan kuivatulle pinnalle levitetään 0,1□0,2 cm³ nestemäistä näytettä tai muun näytteen alkususpensiota.*

Toista maljaparia käytetään muita määriä varten kuten alkususpensio tai näytteen kymmenenkertaiset laimennokset.

Maljoihin laitettua näytettä tai sen laimennosta levitetään ravitsevalle agar-alustalle steriilillä spaattelilla.

Viljelmiä inkuboidaan maljoissa 24 tuntia 37 °C:n lämpötilassa.

5.2.2 *Tyyppiset ja atyyppiset pesäkkeet lasketaan ja määritetään niiden pesäkkeiden bakteerien laktoosin fermentaatiokyky.*

5.2.3 Pesäkkeiden lukumäärä 1 cm:ssä³ tai 1 g:ssa näytettä lasketaan (Venäjän valtionstandardin) GOST 26670 mukaan ottaen huomioon maljoissa kasvaneiden todistettujen tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden lukumäärät.

6 Ravintoalustat, -liemet ja reagenssit

Ravintoalustojen, -lienten ja reagenssien valmistamiseksi käytettävien kemikaalien on oltava analyttistä laatua.

6.1 Selektiivinen ravintoliemi (lauryylisulfaatti-tryptoosiliemi)

6.1.1 Elatusaineen koostumus on esitetty taulukossa 1.

GOST R 52816-2007**Taulukko 1.**

Elatusaineen koostumus	a) Kaksinkertaisesti väkevöity elatusaine	b) Normaali elatusaine
Fermentoitu maito- ja eläinproteiiniuute, g	40	20
Laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O), g	10	5
Kahdenarvoinen kaliumfosfaatti (K ₂ HPO ₄), g	5,5	2,75
Yhdenarvoinen kaliumfosfaatti (KH ₂ PO ₄), g	5,5	2,75
Natriumkloridi, g	10	5
Natriumlauryylisulfaatti, g	0,2	0,1
Vesi, cm ³	1000	1000

6.1.2 Valmistus

Ainekset tai dehydroitu valmis elatusaine laimennetaan veteen lämmitettäessä. pH-arvo asetetaan niin, että steriloinnin jälkeen se on (6,8 ± 0,2) 25 °C:n lämpötilassa.

Elatusaine kaadetaan 10 cm:n³ annoksin n. 16 x 160 mm:n koeputkiin, joissa on durham-putket (kellukkeet), jos käytetään normaalia elatusainetta, ja n. 20 x 200 mm:n koeputkiin ilman durham-putkia (kellukkeita), jos käytetään kaksinkertaisesti väkevöityä elatusainetta.

Elatusaine steriloidaan painekattilassa (121 ± 1) °C:n lämpötilassa 15 min. Steriloinnin jälkeen durham-putkissa (kellukkeissa) ei saa olla ilmakuplia.

6.2 Briljanttivihreä-laktoosi-sappi-liemi**6.2.1 Ainekset:**

fermentoitu kaseiiniuute	10 g;
laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O),	10 g;
sappi	20 g;
briljanttivihreä	0,0133 g
(tai 2,66 cm ³ kohdan 6.2.3 mukaan valmistettua liuosta, jos elatusaine valmistetaan erillisistä aineksista);	
vesi	1000 cm ³

6.2.2 Valmistus

Ainekset tai dehydroitu valmis elatusaine laimennetaan veteen lämmitettäessä. pH-arvo asetetaan niin, että steriloinnin jälkeen se on (7,2 ± 0,2) 25 °C:n lämpötilassa. Elatusaine kaadetaan ja steriloidaan kohdan 6.1.2 mukaan.

6.2.3 Briljanttivihreä-liuos**6.2.3.1 Ainekset:**

briljanttivihreä	0,5 g;
Vesi	100 cm ³

6.2.3.2 Valmistus

Briljanttivihreä siirretään posliinihuhmareeseen ja laimennetaan asteittain tislattuun veteen. Liuos kaadetaan 100 cm:n³ mittapulloon ja lisätään vettä merkkiin asti.

6.3 Selektiivinen rikastusliemi (MacConkey-liemi)

6.3.1 MacConkey-liemen koostumus on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

Elatusaineen koostumus	a) Kaksinkertaisesti väkevöity elatusaine	b) Normaali elatusaine
Peptoni, g	40	20
Laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O), g	20	10
Sappi, g	10	5

GOST R 52816-2007

Taulukon 2 loppu

Elatusaineen koostumus	a) Kaksinkertaisesti väkevöity elatusaine	b) Normaali elatusaine
Bromkresolipurppura-liuos, g	2	1
Natriumkloridi, g	10	5
Vesi, cm ³	1000	1000

6.3.2 Valmistus

Ainekset laimennetaan veteen lämmitettäessä. Lämmitetään pienellä tulella kiehuvaaksi, keitetään 1–2 min, suodatetaan vanu- ja harsosuodattimen läpi, lisätään määrää 1 dm:iin³ asti, jäädytetään 45 °C – 55 °C:en asti ja asetetaan pH-arvo niin, että steriloinnin jälkeen se on (7,2 ± 0,1) 25 °C:n lämpötilassa. Elatusaine kaadetaan ja steriloidaan kohdan 6.1.2 mukaan.

6.3.3 Bromkresolipurppura-liuos

6.3.3.1 Ainekset:

bromkresolipurppura	1 g;
natriumihydroksiidiliuos, jossa (NaOH) = 0,1 moolia/dm ³	19 cm ³ ;
vesi	80 cm ³ .

6.3.3.2 Valmistus

Bromkresolipurppura siirretään posliinihumareeseen, jossa on 19 cm³ natriumhydroksiidiliuosta, jossa (NaOH) = 0,1 moolia/dm³, ja liukenemisen jälkeen lisätään vettä.

6.4 Selektiivinen rikastusliemi (Kessler-liemi)

6.4.1 Kessler-liemen koostumus on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Elatusaineen koostumus	a) Kaksinkertaisesti väkevöity elatusaine	b) Normaali elatusaine
Peptoni, g	20	10
Laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O), g	5	2,5
Sappi, g	10	5
Kristalliviolettiliuos, g	4	2
Vesi, cm ³	1000	1000

6.4.2 Valmistus

Ainekset laimennetaan veteen lämmitettäessä. Lämmitetään pienellä tulella kiehuvaaksi, keitetään 1–2 min, suodatetaan vanu- ja harsosuodattimen läpi, lisätään määrää 1 dm:iin³ asti, jäädytetään 45 °C – 55 °C:en asti ja asetetaan pH-arvo niin, että steriloinnin jälkeen se on (7,2 ± 0,1) 25 °C:n lämpötilassa.

Elatusaine annostellaan kohdan 6.1.2 mukaan ja steriloidaan painekattilassa (115 ± 1) °C:n lämpötilassa 20 min.

6.4.3 Kristalliviolettiliuos

6.4.3.1 Ainekset:

kristallivioletti	1 g;
vesi	100 cm ³ .

6.4.3.2 Valmistus

Kristallivioletti siirretään posliinihumareeseen ja laimennetaan asteittain veteen. Liuos kaadetaan 100 cm:n³ mittapulloon ja lisätään vettä merkkiin asti.

6.5 Kristallivioletti-neutraalipunainen-sappi-laktoosi-agar (VRBL-agar)

6.5.1 Ainekset:

fermentoitu eläinkudosuute	7 g;
hiivauute	3 g;

GOST R 52816-2007

laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O),	10 g;
natriumkloridi	6 g;
sappisuolat	1,5 g;
neutraalipunainen	0,03 g
(tai 1 cm ³ kohdan 6.5.3 mukaan valmistettua liuosta, jos elatusaine valmistetaan erillisistä aineksista);	
kristallivioletti	0,002 g
(tai 0,2 cm ³ kohdan 6.4.3 mukaan valmistettua liuosta, jos elatusaine valmistetaan erillisistä aineksista);	
agar	12–18 g
	(riippuu agarin hyytelöintikyvystä);
vesi	1000 cm ³ .

6.5.2 Valmistus

Elatusaineen oikean valmistuksen päätavoitteena on saada tarvittavan selektiivinen ja ominaisuuksiltaan sopiva elatusaine.

Ainekset tai dehydroitu valmis elatusaine sekoitetaan huolellisesti veteen ja jätetään muutamaksi minuutiksi. Asetetaan pH-arvo niin, että kiehumisen jälkeen se on (7,4 ± 0,2) 25 °C:n lämpötilassa. Lämmitetään kiehuvaksi välillä hämmentäen. 2 min:n kiehumisen jälkeen jäähdytetään heti vesihauuteessa 44 °C – 47 °C:n lämpötilassa. Vältetään elatusaineen ylikuumenemista eikä käytetä jatkolämmitystä. Elatusainetta ei steriloida painekattilassa. Elatusaineen steriiliyttä seurataan käytön aikana. Elatusaine käytetään 4 tunnin kuluessa valmistuksesta.

6.5.3 Neutraalipunainen-liuos**6.5.3.1 Ainekset:**

neutraalipunainen	3 g;
vesi	100 cm ³ .

6.5.3.2 Valmistus

Neutraalipunainen siirretään posliinihumareeseen ja laimennetaan asteittain tislattuun veteen. Liuos kaadetaan 100 cm:n³ mittapulloon ja lisätään vettä merkkiin asti.

6.6 Briljanttivihreää ja fenolipunaista sisältävä laktoosiagar**6.6.1 Ainekset:**

lihauute	3 g;
peptoni	10 g;
laktoosi (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O),	10 g;
natriumkloridi	5 g;
kahdenarvoinen kaliumfosfaatti (K ₂ HPO ₄)	0,5 g;
kohdan 6.6.3 mukainen fenolipunainen-liuos	40 cm ³ ;
kohdan 6.2.3 mukainen briljanttivihreäliuos	2 cm ³ ;
agar	12–18 g
	(riippuu agarin hyytelöintikyvystä).

6.6.2 Valmistus

Ainekset laimennetaan veteen lämmitettäessä. Lihauutteen puuttuessa voidaan käyttää lihauutteen, peptonin ja tislattun veden sijaan GOST 10444.1 -standardin mukaan valmistettua lihapeptoni-lientä. Seosta lämmitetään aineosien täydelliseen liukenemiseen asti, lisätään määrää 1 dm:iin³ asti, jäähdytetään 45 °C – 55 °C:en asti, asetetaan pH-arvo niin, että steriloinnin jälkeen se on (7,0 ± 0,1) 25 °C:n lämpötilassa, ja annostellaan pulloihin. Elatusaine steriloidaan (115 ± 1) °C:n lämpötilassa 20 min ja jäähdytetään 45 °C – 55 °C:en asti. Steriloinnin jälkeen lisätään fenolipunainen- ja briljanttivihreäliuosta.

GOST R 52816-2007

6.6.3 Fenolipunainen-liuos

6.6.3.1 Ainekset:

fenolipunainen	0,2 g;
vesi	100 cm ³ .

6.6.3.2 Valmistus

Fenolipunainen siirretään posliinihuhmareeseen ja laimennetaan asteittain tislattuun veteen. Liuos kaadetaan 100 cm:n³ mittapulloon ja lisätään vettä merkkiin asti.

6.7 Endo-agar

Elatusaine valmistetaan etiketissä olevien ohjeiden mukaan.

6.8 Laktoosia sisältävä Hiss-kasvualusta

Elatusaine valmistetaan etiketissä olevien ohjeiden tai GOST 10444.1 -standardin mukaan.

6.9 KJH-agar (kuiva ravintoagar kalajauhon hydrolysaatin pohjalla bakteerien viljelyä varten)

Elatusaine valmistetaan etiketissä olevien ohjeiden mukaan.

6.10 Lihapeptoni-agar

Elatusaine valmistetaan GOST 10444.1 -standardin mukaan.

6.11 Mikäli ravintoalustoja/-liemiä valmistettaessa käytetään tavallista naudansappea, sillä korvataan kuivattu sappi (1 g kuivattua sappea on yhtä kuin 10 cm³ tavallista sappea). Tällöin elatusaineiden valmistamiseksi käytettävän tislattun veden määrää vähennetään tavallisen sapen määrällä eli elatusaineen kokonaistilavuuden on oltava 1 dm³.

6.12 Kohtien 6.2.3, 6.3.3, 6.4.3, 6.5.3 ja 6.6.3 mukaan valmistettuja liuoksia voidaan säilyttää suljetuissa tummissa lasiastioissa huoneenlämmössä enintään 3 kk.

6.13 Liuokset ja reagenssit Gram-värijäystä varten valmistetaan GOST 10444.1 -standardin mukaan.

6.14 Voidaan käyttää valmiita ja dehydroituja mm. kromogeenisia Venäjällä tai ulkomailla valmistettuja ravintoalustoja/-liemiä, jotka on rekisteröity Venäjällä.

7 Laitteet, astiat, tarvikkeet ja reagenssit

Monikäyttöastioiden hyväksyttynä vaihtoehtona ovat kertokäyttöastiat, jos ne täyttävät asianmukaiset vaatimukset.

Käytetään GOST P 51446 ja GOST 10444.1 -standardien mukaisia mikrobiologisiin tutkimuksiin tarkoitettuja tavallisia laboratoriotarvikkeita ja reagensseja seuraavine täydennyksineen:

- laboratoriovaaka, jonka punnitusyläraja on 200 g (reagenssien punnitsemista varten) ja sallittu kertapunnitusvirhe enintään ± 0,01 mg GOST 24104 -standardin mukaan;
- laboratoriovaaka, jonka punnitusyläraja on 1 kg (näytteiden punnitsemista varten) ja sallittu kertapunnitusvirhe enintään ± 20 mg GOST 24104 -standardin mukaan;
- läpikulkuvälissä katselun mahdollistava biologinen mikroskooppi, jonka suurennus on 900^x–1000^x;
- kalvosuodatuslaite;
- bakteriologinen platina-iridium- tai nikkeli-kromi-silmukka läpimitaltaan noin 3 mm;
- GOST 9284 -standardin mukaiset objektilasit;
- GOST 25336 -standardin mukaiset noin 16 x 160 mm:n ja 20 x 200 mm:n koeputket;
- 16 x 160 mm:n koeputkiin kooltaan sopivat durham-putket (kellukkeet);
- termostaatti, jonka lämpötila-alue on 28 °C – 55 °C:n ja joka ylläpitää asetettua lämpötilaa sallitun virheen ollessa ± 1 °C;
- briljanttivihreä;

GOST R 52816-2007

- kuiva tai tavallinen naudansappi;
- lihauute;
- neutraalipunainen;
- tryptoosi-gelatiinihydrolysaatti;
- tryptoosi;
- fenolipunainen;
- fermentoitu eläinkudosuute;
- fermentoitu kaseiiniuute;
- fermentoitu maito- ja eläinproteiiniuute;
- hiivauute.

8 Näytteiden otto ja valmistelu

Näytteet otetaan ja valmistellaan GOST 26668 ja GOST 26669 -standardien mukaan.

On tärkeää, että testaukseen tulee edustava näyte, joka ei ole vahingoittunut tai muuttunut kuljetuksen tai säilytyksen aikana.

9 Testaus

Testauskaavio on esitetty liitteessä A.

9.1 Koliformisten bakteerien toteamismenetelmä

9.1.1 Ainemäärä ja alkulaimennos

Ainemäärät otetaan ja alkulaimennos valmistetaan GOST 26669 -standardin mukaan.

9.1.2 Inokulointi ja inkubointi

9.1.2.1 Riippuen tarvittavista toteamisrajoista $x \text{ cm}^3$ nestemäistä näytettä tai $x \text{ cm}^3$ alkususpensiota, jos käytetään muita näytteitä, siirretään 10 cm^3 kaksinkertaisesti väkevöityä selektiivistä rikastuslientä sisältävään koeputkeen [ks. taulukot 1a, 2a, 3a], kun $1 \text{ cm}^3 < x \leq 10 \text{ cm}^3$, tai 10 cm^3 normaalia selektiivistä rikastuslientä sisältävään koeputkeen [ks. taulukot 1b, 2b, 3b], kun $x \leq 1 \text{ cm}^3$.

Testattaessa runsashappoisia näytteitä elatusaineiden pH-arvon jyrkän laskemisen (0,5:llä ja enemmän) välttämiseksi sen jälkeen, kun niihin on lisätty näyte tai sen laimennos, elatusaineiden sallitut pH-arvot saadaan GOST 10444.1 -standardin mukaan valmistetun steriilin natriumhydroksidiliuoksen avulla. Toisena vaihtoehtona elatusaineita valmistettaessa on asetettua korkeamman pH-arvon asettaminen ottaen huomioon sen myöhempi laskeminen näytteen lisäämisen jälkeen. Lisättävän steriilin natriumhydroksidiliuoksen määrä tai suure, jolla on suurennettava pH-arvoa elatusaineita valmistettaessa, todetaan kokeellisesti.

Voidaan muuttaa pH-arvoa neutraaliksi steriilin natriumhydroksidiliuoksen avulla runsashappoisimmassa näytteessä.

9.1.2.2 Kaksinkertaisesti väkevöityyn elatusaineeseen tehtyjä viljelmiä sisältäviä koeputkia (ks. 9.1.2.1) inkuboidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia.

9.1.2.3 Normaaliin elatusaineeseen tehtyjä viljelmiä sisältäviä koeputkia (ks. 9.1.2.1) inkuboidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia. Ellei ole kaasunmuodostusta tai kaasun toteamista vaikeuttavaa sameutta, inkubointia jatketaan vielä (24 ± 2) tuntia.

9.1.3 Varmistus

9.1.3.1 Inkuboinnin jälkeen koeputkista (ks. 9.1.2.2) inokuloidaan silmukalla normaali varmistusalusta (ks. 6.1–6.4). Viljelmiä inkuboidaan termostaatissa (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia. Ellei kaasunmuodostusta ole, seuranta jatketaan (48 ± 2) tuntiin asti.

Bakteerien eristysalustana käytetään briljanttivihreä-laktoosi-sappi-lientä.

9.1.3.2 Kohdassa 9.1.3.1 esitetty menettely toistetaan kohdan 9.1.2.3 mukaisen inkuboinnin jälkeen koeputkiin, joissa on todettu kaasunmuodostusta tai kaasunmuodostuksen toteamista estävää sameutta (24 ± 2) tai (48 ± 2) tunnin inkuboinnin jälkeen.

9.1.4 Tulosten arviointi

Mahdolliset tulokset on esitetty liitteessä A.

Kohdan 9.1.3.1 tai 9.1.3.2 mukaisia koeputkia, joissa on todettu kaasunmuodostusta (24 ± 2) tai (48 ± 2) tunnin jälkeen, pidetään positiivisina.

GOST R 52816-2007

Todettaessa koliformisia bakteereja otetaan huomioon niiden esiintyminen tai esiintymättömyys x g:ssa ainemäärää tai x cm:ssä³ näytettä.

9.2 Todennäköisimmän luvun menetelmä — koliformisten bakteerien laskenta

Määritettäessä koliformisten bakteerien lukumäärää todennäköisimmän luvun menetelmän mukaan viljellään vähintään kolme peräkkäistä näytteen ainemäärää ja/tai sen kymmenenkertaista laimennosta.

9.2.1 Ainemäärä, alkususpensio ja laimennokset

Ainemäärät otetaan sekä alkulaimennos ja kymmenenkertaiset laimennokset valmistetaan GOST 26669 -standardin mukaan.

Valmistetaan riittävä määrä laimennoksia GOST 26669 -standardin mukaan taaten, että kaikki loppulaimennoksen mukaiset koeputket osoittavat negatiivisen tuloksen.

9.2.2 Inokulointi ja inkubointi

9.2.2.1 Käytetään kolme koeputkea jokaista näytteen ainemäärää ja/tai sen laimennosta varten.

9.2.2.2 Steriilillä pipetillä siirretään kuhunkin kolmesta koeputkesta, jotka sisältävät yhtä selektiivisistä kahdenkertaisesti väkevöidyistä rikastusalustoista/-liemistä [ks. taulukot 1a, 2a, 3a], 10 cm³ nestemäistä näytettä tai 10 cm³ alkususpensiota, jos käytetään muita näytteitä.

Jokainen näytteen ainemäärä viljellään kolmesti kahdenkertaisesti väkevöityyn elatusaineeseen 20 x 200 mm:n koeputkiin.

Viljeltävän näytteen ja kaksinkertaisesti väkevöidyn ravintoalustan/-liemen suhde on 1:1.

9.2.2.3 Toisella steriilillä pipetillä siirretään kuhunkin kolmesta koeputkesta, jotka sisältävät yhtä selektiivisistä normaaleista rikastusalustoista/-liemistä [ks. taulukot 1b, 2b, 3b], 1 cm³ nestemäistä näytettä tai 1 cm³ alkususpensiota, jos käytetään muita näytteitä.

Jokainen näytteen ainemäärä ja/tai sen laimennokset viljellään kolmesti 16 x 160 mm:n koeputkiin.

Viljeltävän näytteen tai sen laimennoksen ja ravintoalustan/-liemen suhde on 1:10.

9.2.2.4 Kukin seuraava laimennos viljellään kohdan 9.2.2.3 mukaan käyttäen uutta steriiliä pipettiä. Inokulumi ja elatusaine sekoitetaan varovasti.

9.2.2.5 Kaksinkertaisesti väkevöityyn elatusaineeseen tehtyjä viljelmiä sisältäviä koeputkia (ks. 9.2.2.2) inkuboidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia,

9.2.2.6 Normaaliin elatusaineeseen tehtyjä viljelmiä sisältäviä koeputkia (ks. 9.2.2.3 ja 9.2.2.4) inkuboidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia. Ellei ole kaasunmuodostusta eikä/tai kaasunmuodostuksen toteamista estävää sameutta, inkubointia jatketaan vielä (24 ± 2) tuntia.

9.2.3 Varmistus

9.2.3.1 Kohdan 9.2.2.5 mukaisen inkuboinnin jälkeen jokaisesta koeputkesta (ks. 9.1.2.2) inokuloidaan silmukalla normaali varmistusalusta (6.1b–6.4b). Viljelmiä inkuboidaan termostaatissa (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia. Ellei kaasunmuodostusta tai sameutta ole, inkubointia jatketaan vielä (24 ± 2) tuntia.

Bakteerien eristysalustana käytetään briljanttivihreä-laktoosi-sappi-lientä.

9.2.3.2 Kohdassa 9.2.3.1 esitetty menettely toistetaan kohdan 9.2.2.6 mukaisen inkuboinnin jälkeen koeputkiin, joissa on todettu kaasunmuodostusta ja/tai sameutta (24 ± 2) tai (48 ± 2) tunnin jälkeen.

Nestemäiselle varmistusalustalle uudelleenviljely on tarpeetonta, jos normaaleilla nestemäisillä elatusaineilla on selvää kaasunmuodostusta. Tällöin viljelmiä pidetään positiivisina.

9.2.4 Tulosten arviointi

Mahdolliset tulokset on esitetty liitteessä A.

Jokaista näytteen ainemäärää ja/tai sen laimennosta varten lasketaan koeputket, joissa on todettu kaasunmuodostusta (positiiviset koeputket) (24 ± 2) ja (tarvittaessa) (48 ± 2) tunnin jälkeen.

9.2.5 Tulosten laskenta ja ilmaiseminen

Lasketaan todennäköisin luku ottaen huomioon positiiviset koeputket jokaisessa näytteen ainemäärässä ja/tai sen laimennoksessa. GOST 26670 -standardin mukaan määritetään koliformisten bakteerien todennäköisin luku 1 g:ssa tai 1 cm:ssä³ näytettä.

9.3 Koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen — pesäkelaskenta

9.3.1 Ainemäärä ja alkulaimennos

Ainemäärät otetaan ja alkulaimennos valmistetaan GOST 26669 -standardin mukaan.

GOST R 52816-2007

9.3.2 Inokulointi ja inkubointi

9.3.2.1 Nestemäisen näytteen ja/tai sen jokaisen laimennoksen viljelyyn käytetään kahta rinnakkaista petrimaljaa. Steriilillä pipetillä siirretään 1 cm³ nestemäistä näytettä tai sen sopivaa laimennosta jokaisen maljan keskipisteeseen. Viljeltäessä nestemäistä näytettä ja/tai jokaista laimennosta petrimaljaan käytetään eri steriiliä pipettiä.

9.3.2.2 Jokaiseen petrimaljaan (ks. 9.3.2.1) kaadetaan noin 15 cm³ yhtä elatusaineista (ks. 6.5–6.7), jonka lämpötila on 44 °C – 47 °C. Näytteen ja/tai sen laimennoksen petrimaljaan viljelyn ja elatusaineen lisäämisen välinen aika ei saa ylittää 15 min.

Sekoitetaan huolellisesti inokulaatti ja elatusaine ja jätetään seos hyytymään. Tällöin petrimaljat siirretään kylmälle vaakapinnalle.

Bakteerien eristysalustana käytetään VRBL-agarina.

Samalla agar-elatusaineen steriililyden tarkastamiseksi petrimaljaan kaadetaan noin 5 cm³ elatusainetta ja inkuboidaan viljelmien kanssa.

9.3.2.3 Elatusaineen hyydyttyä petrimaljoissa sen pinnalle kaadetaan noin 4 cm³ käytettyä agar-elatusainetta (ks. 6.5–6.7), jonka lämpötila on 44 °C – 47 °C, toisen kerroksen tekemiseksi. Lisätyn elatusaineen on hyydyttävä, kuten on esitetty kohdassa 9.3.2.2.

9.3.2.4 *Todettaessa koliformisia bakteereja viljelemällä selektiivi-diagnostisille agar-alustoille (ks. 6.5–6.7) 0,1 tai 0,2 cm³ näytteen ainemäärää tai sen laimennosta levitetään toiselle näistä elatusaineista, jotka on kaadettu kahteen rinnakkaiseen petrimaljaan. Elatusainetta sisältävät petrimaljat valmistellaan viljelyyn ja viljely suoritetaan GOST 26670 -standardin mukaan.*

Soveltaessa kalvosuodatusmenetelmää GOST 26670 -standardin mukaan suodattimet siirretään selektiivi-diagnostisen agar-alustan pinnalle välttämällä ilmakuplien muodostusta kasvualustan ja suodattimen väliin. Suodattimen pinnan, johon bakteerit ovat saostuneet, on oltava käännettynä ylöspäin.

Viljeltäessä kalvosuodatusmenetelmän mukaan suodattimilla lasketaan pesäkkeet myös silloin, kun niitä on alle 15.

9.3.2.5 Kohtien 9.3.2.3 ja 9.3.2.4 mukaan valmistellut maljat käännetään kansi alaspäin ja niitä inkuboidaan termostaatissa (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 2) tuntia.

9.3.3 Pesäkelaskenta

Kohdan 9.3.2.6 mukaisen inkuboinnin jälkeen valitaan maljat, joille on kasvanut 15–150 pesäkettä. Viljelmät tarkastetaan ja todetaan tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden kasvu.

VRBL-agarilla koliformisten bakteerien tyyppiset pesäkkeet ovat purppuranpunaisia läpimitaltaan vähintään 0,5 mm, joskus sapan punertavan presipitaattivyöhykkeen (saostuman) ympäröimiä.

Briljanttivihreä- ja fenolipunainen-agarilla koliformisten bakteerien tyyppiset pesäkkeet ovat vihertäviä ja kirkkaan keltavihreän vyöhykkeen ympäröimiä.

Endo-agarilla tyyppiset koliformisten bakteerien pesäkkeet ovat vaaleanpunaisia tai punaisia, usein metallisävyisiä.

Atyyppiset pesäkkeet eroavat tyyppisistä väriltään ja kooltaan. Atyyppisinä pidetään myös kaikkia tyyppisiä pesäkkeitä, jotka ovat kasvaneet sokerien fermentoinnin tuloksena lukuun ottamatta elintarvikkeiden sisältämää laktoosia. Tällaiset pesäkkeet eivät ole koliformisia bakteereja.

Agar-alustoilla tyyppiset ja atyyppiset pesäkkeet lasketaan erikseen.

9.3.4 Varmistus siitä, että pesäkkeen bakteerit ovat koliformisia bakteereja

Valitaan vähintään viisi atyyppistä ja tyyppistä pesäkettä. Jokainen valittu pesäke viljellään uudelleen koeputkiin, jotka sisältävät yhtä kohtien 6.1–6.4 mukaan valmistetuista ravintoliemistä.

Bakteerien eristysaineena käytetään laktoosi-briljanttivihreä-sappi-lientä.

Kasvu ja kaasunmuodostus (37 ± 1) °C:n lämpötilassa 24 tunnin kuluessa osoittavat, että atyyppisten ja tyyppisten pesäkkeiden bakteerit ovat koliformisia bakteereja.

9.3.5 Tulosten laskenta ja ilmaiseminen

Mikäli todettaessa tyyppisiä tai atyyppisiä pesäkkeitä 80 %:ssa tapauksista eli vähintään neljässä viidestä pesäkkeistä on todettu koliformisten bakteerien kasvua, katsotaan, että kaikki petrimaljoille kasvaneet pesäkkeet (ks. 9.3.3) ovat koliformisia bakteereja. Muissa tapauksissa koliformisten bakteerien lukumäärä todetaan ottaen huomioon varmistettujen pesäkkeiden ja varmistamista varten otettujen pesäkkeiden yhteismäärän prosenttisuhde.

GOST R 52816-2007

Agar-liemiin tai -alustoille viljelemällä määritetty koliformisten bakteerien lukumäärä 1 g:ssa/cm:ssä³ näytettä lasketaan uudelleen GOST 26670 -standardin mukaan.

Näytteen tietyssä ainemäärässä koliformisten bakteerien laskennan ja toteamisen tulokset kirjataan GOST 26670 -standardin mukaan.

9.3.6 *Voidaan todeta koliformiset bakteerit viljelemällä agar-liemeen tai -alustalle sillä ehdolla, että näytteen ainemäärä, joka aiotaan tutkia, on mahdollista viljellä tämän menetelmän mukaan.*

Todettaessa koliformisia bakteereja viljelemällä agar-liemeen tai -alustalle pesäkkeitä ei lasketa.

10 Lisävarmennus siitä, että todetut bakteerit ovat koliformisia bakteereja

10.1 *Tarvittaessa lisävarmistukseksi siitä, että nestemäisillä elatusaineilla (joissa on todettu kaasunmuodostusta) kasvaneet bakteerit ovat koliformisia bakteereja, viljellään uudelleen GOST 26670 -standardin mukaan yhdelle selektiivi-diagnostiselle agar-alustalle (ks. 6.5–6.7). Viljelmiä inkuboidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 3) tuntia. Termostoinnin jälkeen todetaan tyyppisten ja atyyppisten pesäkkeiden kasvua.*

10.2 *Lisävarmistukseksi siitä, että kasvaneet bakteerit ovat koliformisia bakteereja, valitaan vähintään viisi tyyppistä ja atyyppistä pesäkettä kohdan 9.3.3 mukaisia viljelmiä sisältävistä petrimaljoista.*

Valitaan ne atyyppiset pesäkkeet, joissa koliformiset bakteerit on todettu viljelemällä varmistusliemeen.

10.3 *Jokainen varmistettavaksi valittu pesäke viljellään uudelleen viistetyn ravintoagarin pinnalle kohdan 6.9 tai 6.10 mukaan. Viljelmiä termostoidaan (31 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 3) tuntia.*

Koliformisiin bakteereihin kuuluvuus määrytyy Gram-värjäyksen, oksidaasin esiintymättömyyden ja Hiss-alustalla tapahtuvan laktoosin fermentoinnin perusteella.

10.3.1 Gram-värjäys

Ravintoagarin viistetylle pinnalle kasvaneista viljelmistä basillinäytteiden valmistus ja Gram-värjäys suoritetaan GOST 30425 -standardin mukaan. Koliformiset bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja.

Gram-värjäys voidaan korvata Gregorsen-testillä. Tällöin objektilasilla 3 %:sen kaliumihydroksiidin vesiliuoksesta emulgoidaan silmukalla kasvualustalla olevasta pesäkkeestä otettu pieneliöiden viljelmiä. Mikäli muutaman sekunnin jälkeen silmukan perässä venyy limalankoja, se osoittaa, että testattava viljelmiä on gramnegatiivista lajia. Grampositiiviset bakteerit eivät muodosta limalankoja.

10.3.2 Oksidaasin esiintymättömyyden määrittäminen

Oksidaasin esiintymättömyys määritetään GOST 29184 -standardin mukaan.

Oksidaasin määrittämiseksi voidaan käyttää Venäjällä ja ulkomailla teollisesti valmistettuja levyjä ja liuoksia, jotka on rekisteröity Venäjällä. Levyjen ja liuosten laadunvalvontaa varten käytetään oksidaasipositiivisia ja oksidaasinegatiivisia viljelmiä.

10.3.3 Laktoosin fermentoinnin määrittäminen

Laktoosin fermentoinnin määrittämiseksi testattava viljelmiä viljellään ruiskeella laktoosia sisältävään Hiss-elatusaineeseen.

Viljelmiä termostoidaan (37 ± 1) °C:n lämpötilassa (24 ± 3) tuntia.

Koliformiset bakteerit fermentoivat laktoosia muodostaen happoa (elatusaineen väri muuttuu) ja kaasua.

GOST R 52816-2007

10.4 Lisävarmistustulosten mukaan koliformisina bakteereina pidetään aerobisia ja fakultatiivisesti anaerobisia, itiöitä muodostamattomia gramnegatiivisia oksidaasinegatiivisia sauvoja, jotka fermentoivat laktoosia muodostaen happoa ja kaasua.

11 Testauspöytäkirja

Tulokset arvioidaan jokaisesta näytteestä erikseen.

Testauspöytäkirjaan on sisällytettävä:

- kaikki näytteen täydelliseen identifiointiin tarvittavat tiedot;
- käytettävä menetelmä tämän standardin mukaan;
- kaikki tähän standardiin säätämättä jääneet testauksen yksityiskohdat;
- saatu/saadut tulos/tulokset.

GOST R 52816-2007

Liite A
(ohjeellinen)

Koliformisten bakteerien toteamiskaavio

Koliformisten bakteerien toteamiskaavio on esitetty piirroksessa A.1.

Toteamiskaavio viljelemällä agar-liemeen tai -alustalle		Koliformisten bakteerien näytteen 1 g:ssa/cm:ssä ³ toteamiskaavio	
1 cm ³ agar-liemeen	0,1 tai 0,2 cm ³ näytettä agar-alustalle	10 cm ³ valmistettua kovaa näytettä	1 cm ³ näytettä
Viljelmien inkubointi (37 ± 1) °C:ssa (24 ± 2) tuntia	Valitaan viisi tyyppistä ja viisi atyyppistä pesäkettä, jotka tutkitaan kukin erikseen.	10 cm ³ Kaksinkertaisesti väkevöidyt elatusaineet	10 cm ³ Normaalit elatusaineet
		Inkubointi (37 ± 1) °C:ssa (24 ± 2) tuntia	Inkubointi (37 ± 1) °C:ssa 24–48 tuntia
		Uudelleenviljely jokaisesta koeputkesta	Mikäli on kaasunmuodostusta ja/tai sameutta, viljellään uudelleen koeputkiin, joissa on 16 cm ³ normaalia elatusainetta.
Varmistus: 1 Gram-värjäys 2 Oksidaasin esiintymättömyys 3 Laktoosin fermentointi Hiss-alustalla			Inkubointi (37 ± 1) °C:ssä 24–48 tuntia
		Mikäli tarvitaan varmistusta, viljellään uudelleen agar-alustalle.	Mahdollinen tapaus: a) kasvu kaasua muodostaen — todettu b) kasvu ilman kaasunmuodostusta — ei todettu c) ilman kasvun merkkejä — ei todettu
		Inkubointi (37 ± 1) °C:ssä 24 tuntia	

Piirros A.1

GOST R 52816-2007**Liite B
(ohjeellinen)****Tämän standardin ja siihen sovellettujen kansainvälisten standardien rakenteiden vertailu**

B.1 Tämän standardin ja ISO 4831:2006 -standardin rakenteiden vertailu on esitetty taulukossa B.1.

Taulukko B.1

ISO 4831:2006 -kansainvälisen standardin rakenne			Tämän standardin rakenne		
Luku	Momentit	Kohdat	Luku	Momentit	Kohdat
1 Käyttöala	–	–	1 Soveltamisala	–	–
2 Viitenormit	–	–	2 Viitenormit	–	–
3 Termit ja määritelmät	3.1–3.3	–	3 Termit ja määritelmät	3.1–3.3	3.3.1, 3.3.2
4 Menetelmän kuvaus	4.1, 4.2	4.1.1–4.1.3, 4.2.1–4.2.6	4 Koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen todennäköisimmän luvun menetelmän mukaan	4.1, 4.2	4.1.1–4.1.3, 4.2.1–4.2.5
5 Ravintoalustat/liemet ja laimennokset	5.1–5.4	–	6 Ravintoalustat/liemet ja reagenssit	6.1–6.14	–
6 Laitteet ja astiat	6.1–6.7	–	7 Laitteet, astiat, tarvikkeet ja reagenssit	–	–
7 Näytteenotto	–	–	8 Näytteiden otto ja valmistelu	–	–
8 Näytteiden valmistus	–	–			
9 Testi	9.1, 9.2	9.1.1–9.1.4, 9.2.1–9.2.4	9 Testaus	9.1, 9.2	9.1.1–9.1.4, 9.2.1–9.2.5
10 Tulosten laskenta ja ilmaiseminen	–	–	10 Lisävarmennus siitä, että todetut bakteerit ovat koliformisia bakteereja	10.1–10.4	–
11 Tarkkuus	–	–	–	–	–
12 Testauspöytäkirja	–	–	11 Testauspöytäkirja	–	–
Liite A	–	–	Liite A	–	–

GOST R 52816-2007

B.2 Tämän standardin ja ISO 4832:2006 -standardin rakenteiden vertailu on esitetty taulukossa B.2.

Taulukko B.2

ISO 4832:2006 -kansainvälisen standardin rakenne			Tämän standardin rakenne		
Luku	Momentit	Kohdat	Luku	Momentit	Kohdat
1 Käyttöala	–	–	1 Käyttöala	–	
2 Viitenormit	–	–	2 Viitenormit	–	
3 Termit ja määritelmät	3.1	–	3 Termit ja määritelmät	3.1–3.3	
4 Agar-liemeen viljelymenetelmän kuvaus	4.1–4.4	–	5 Kolibakteerien lukumäärän määrittäminen menetelmät — kolonioiden laskenta	5.1, 5.2	5.1.1–5.1.3, 5.2.1–5.2.3
5 Ravintoalustat/liemet ja laimennokset	5.1–5.4	–	6 Ravintoalustat/liemet ja reagenssit	6.1–6.14	–
6 Laitteet ja astiat	6.1–6.11	–	7 Laitteet, astiat, tarvikkeet ja reagenssit	–	–
7 Näytteenotto	–	–	8 Näytteiden otto ja valmistelu	–	–
8 Näytteiden valmistelu	–	–			
9 Testi, joka varmistaa vain atyyppisten pesäkkeiden kuuluvuuden koliformisiin bakteereihin	9.1–9.4	9.2.1–9.2.4	9 Testaus	9.3	9.3.1–9.3.6
10 Tulosten ilmaiseminen	–	–	10 Lisävarmennus siitä, että todetut bakteerit ovat koliformisia bakteereja	10.1–10.4	–
11 Tarkkuus	–	–	–	–	–
12 Testauspöytäkirja	–	–	11 Testauspöytäkirja	–	–
–	–	–	Liite A	–	–

GOST R 52816-2007

Liite C
(ohjeellinen)Tietoja kansainvälisten viitestandardien vastaavuudesta suhteessa tässä standardissa viitenormeina
käytettyihin Venäjän kansallisiin standardeihin

Taulukko C.1

Kansainvälisen ja Venäjän kansallisen viitestandardin merkintä	Kansainvälisen viitestandardin merkintä ja nimitys sekä sen sovinnainen vastaavuusmerkintä suhteessa Venäjän kansalliseen viitestandardiin
GOST R 51446-99 (ISO 7218-96)	ISO 7218:1996 "Elintarvikkeiden ja eläinten ruokien mikrobiologia. Mikrobiologisten tutkimusten yleissäännöt" (MOD)
GOST 9284-75	<input type="checkbox"/>
GOST 10444.1-84	<input type="checkbox"/>
GOST 24104-2001	<input type="checkbox"/>
GOST 25336-82	<input type="checkbox"/>
GOST 26668-85	<input type="checkbox"/>
GOST 26669-85	<input type="checkbox"/>
GOST 26670-81	<input type="checkbox"/>
GOST 29184-91	<input type="checkbox"/>
GOST 30425-97	<input type="checkbox"/>

Huomautus. Tässä taulukossa on käytetty seuraavaa standardien sovinnasta vastaavuusmerkintää:
- MOD — muunneltu standardi.

UDK 663/.664:543.9:006.354

OKS 07.100.30

N09

OKSTU 9109

Avainsanat: koliformiset bakteerit, pesäkkeitä muodostavat yksiköt (pmy), tyyppiset ja atyyppiset pesäkkeet, ravintoalustat/liemet, viljelmien inkubointi, *oksideasi*, *Gram-värijäys*, todennäköisin luku