ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54653— 2011

УДОБРЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИЕ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 года № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт органических удобрений и торфа» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИОУ» Россельхозакадемии) и Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 25 «Качество почв, грунтов и органических удобрений»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 802-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2012

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 4
4 Общие положения 5
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, культуральные среды, посуда, материалы 5
6 Приготовление сред и реактивов 8
7 Отбор и подготовка проб 11
8 Подготовка к проведению анализа 11
9 Методы микробиологического анализа органических удобрений 14
Приложение А (справочное) Состав дезинфицирующих растворов 17
Приложение Б (справочное) Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов 18
Приложение В (справочное) Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от объема сосудов 19
Приложение Г (справочное) Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем 20
Приложение Д (справочное) Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди) 21
Приложение Е (справочное) Схема оценки микробиологических характеристик органических удобрений 23
Библиография 24

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УДОБРЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИЕ

Методы микробиологического анализа

Organic fertilizers.
Methods of microbiological analysis

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на органические удобрения и устанавливает методы микробиологического анализа.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 10576-1—2006 Статистические методы. Руководство по оценке соответствия установленным требованиям. Часть 1. Общие принципы

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 50962—96 Посуда и изделия хозяйственного назначения из пластмасс. Общие технические условия

ГОСТ Р 51232—98 Общие требования к организации и методам контроля качества

ГОСТ Р 51564—2000 Аппараты и установки сушильные и выпарные. Требования безопасности. Методы испытаний

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 51935—2002 (ЕН 285—96) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ Р 52361—2005 Контроль объекта аналитический. Термины и определения

ГОСТ Р 53042—2008 Удобрения органические. Термины и определения

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 54519—2011 Удобрения органические. Методы отбора проб

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества, Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 83—79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 171—81 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия.

ГОСТ 435—77 Реактивы. Марганец (II) сернокислый 5-водный. Технические условия

ГОСТ 450—77 Кальций хлористый технический. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 480—78 Пластины асбестоцеллюлозные фильтрующие и стерилизующие. Технические условия

ГОСТ 490—2006 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 828—77 Натрий азотнокислый технический. Технические условия

ГОСТ 1027—67 Реактивы. Свинец (II) уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 1341—97 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 1820—2001 Спички. Технические условия

ГОСТ 2156—76 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 2493—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118—74 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 3652—69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 3758—75 Реактивы. Алюминий сернокислый 18-водный. Технические условия

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 3769—78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 3773—72 Реактивы. Аммоний хлористый. Технические условия

ГОСТ 4144—79 Реактивы. Калий азотистокислый. Технические условия

ГОСТ 4145—74 Реактивы. Калий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4147—74 Реактивы. Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4148—78 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4165—78 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4217—77 Реактивы. Калий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4232—74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234—77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрий гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4517—87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4529—78 Реактивы. Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 4530—76 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 4919.1—77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 5538—78 Реактивы. Калий лимоннокислый 1-водный. Технические условия

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5821—78 Реактивы. Кислота сульфаниловая. Технические условия

ГОСТ 5833—75 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5845—79 Реактивы. Калий-натрий виннокислый 4-водный. Технические условия

ГОСТ 6038—79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6259—75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6419—78 Реактивы. Магний углекислый основной водный. Технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6691—77 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 8253—79 Мел химический осажденный. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 9871—75 Термометры стеклянные ртутные электроконтактные и терморегуляторы. Технические условия

ГОСТ 10163—76 Реактивы. Крахмал растворимый. Технические условия

ГОСТ 10354—82 Пленка полиэтиленовая. Технические условия

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10929—76 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ 10931—74 Реактивы. Натрий молибденовокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ ISO 11133-1—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 15530—93 Парусины и двунитки. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17151—81 Посуда хозяйственная из листового алюминия. Общие технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17308—88 Шпагаты. Технические условия

ГОСТ 17626—81 Казеин технический. Технические условия

ГОСТ 17811—78 Мешки полиэтиленовые для химической продукции. Технические условия

ГОСТ 18963—73 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа

ГОСТ 19126—2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

ГОСТ 19808—86 Стекло медицинское. Марки

ГОСТ 19881—74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 19906—74 Нитрит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 20083—74 Дрожжи кормовые. Технические условия

ГОСТ 20730—75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 21239—93 (ИСО 7741) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280—76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 22649—83 Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия

ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706—83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 27068—68 Реактивы. Натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) 5-водный. Технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29112—91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29251—91 (ИСО 385-1—84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и

по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52361, ГОСТ Р 53042, ГОСТ Р 54519, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бактерии рода Cytophaga:** Клетки слегка извитые, палочки с заостренными концами длиной 3—8 мкм.

Примечание — Разные виды образуют на клетчатке колонии в виде желтых, розовых и коричневых пятен.

3.2 **бактерии рода Cellvibrio:** Мелкие, слегка изогнутые в виде полумесяца, неспорообразующие палочки с закругленными концами, длиной 3—4 мкм, шириной 0,4—0,5 мкм.

Примечание — На поверхности фильтровальной бумаги распространяются очень быстро, окрашивая ее в охряно-желтый цвет.

3.3 **бактерии рода Cellfalcicula:** Палочковидные клетки, утолщенные в центре, с заостренными концами.

Примечание — Образуют слизистые зеленые колонии, пигмент легко диффундирует в среду, окрашивая ее в зеленый цвет.

3.4 **бактерии рода Polyangium и Sorangium:** Клетки палочковидные, при старении укорачиваются и образуют микроцисты, которые собраны по 12—40 клеток в цисту.

Примечание — На клетчатке образуют колонии в виде слизистого налета желтого, оранжевого или темно-коричневого цвета.

3.5 **грибы рода Dematium:** Грибы, образующие одноклеточные бесцветные конидии округлой и овальной формы; вегетативные клетки темные, цилиндрические собраны в цепочки.

Примечание — На целлюлозе имеют вид черных пятен.

3.6 **грибы рода Stachybotris:** Колонии черные, бархатистые, спорангии покрыты темноокрашенными спорами.

3.7 **грибы рода Cladosporium:** Конидиеносцы длинные, многоклеточные, от них отпочковываются неправильной формы конидии, колонии окрашены в светлый оливково-зеленый цвет.

3.8 **грибы рода Chaetomium:** Образуют перитеции серого или зеленоватого цвета.

3.9 **грибы рода Fumago:** Колонии на целлюлозе темные и состоят из скоплений в виде узелков темных овальных и округлых хламидоспор.

3.10 **бактерии рода Nocardia:** Колонии пастообразные, слизистые, сухие, по периферии образуется мицелиальная зона или ободок, состоящий из субстратного и надсубстратного мицелия, в центре колонии чаще преобладают фрагментированные гифы, состоящие из палочковидных кокковидных клеток, колонии бесцветные, лимонно-желтые, розовые, красные.

3.11 **актиномицеты рода Micromonospora:** Компактный мицелий полностью погружен в субстрат и едва заметен под микроскопом.

Примечание — На поверхности агара кольцеобразно или радиально располагаются бесцветные или темноокрашенные комочки слизи, содержащие споры.

3.12 **бактерии рода Bactoderma:** Колонии мелкие в виде розовой или белой бархатистой пленки, в центре она складчатая, а по периферии – стекловидная, край колонии волнистый.

3.13 **бактерии рода Arthrobacter:** Колонии мелкие, плоские или слегка приподнятые, бесцветные, по периферии образуется кружевной или складчатый ободок, у отдельных представителей края колоний зазубренные, молодая культура состоит из мелких искривленных палочек, затем они довольно быстро распадаются, чаще на кокковидные клетки.

3.14 **азотфиксирующие бактерии рода Clostridium pasteurianum:** Облигатный анаэроб, имеет форму палочек с перитрихально расположенными жгутиками, образует овальные споры, окруженные капсулой, клетки накапливают гранулезу, которая окрашивается при воздействии раствора Люголя в сине-фиолетовый цвет.

Примечание — Энергию для всех процессов жизнедеятельности, в том числе и ассимиляции атмосферного азота, бактерии этого вида получают за счет маслянокислого брожения.

3.15 **азотфиксирующие бактерии рода Azotobacter chroococcum:** Колонии темно-коричневого, почти черного цвета, в жидких культурах бактерии образуют пленку, а на агаре слизистые колонии, молодые клетки имеют вид попарно соединенных крупных, коротких палочек с закругленными концами, по мере развития они становятся эллипсоидными, а затем круглыми.

4 Общие положения

4.1 Общие требования проведения микробиологического анализа — по ГОСТ ISO 7218.

4.2 Требования безопасности

Требования безопасности при работе с микроорганизмами — по [1], [2]; с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007; с электрооборудованием — по ГОСТ Р 12.1.019.

Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

4.3 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, культуральные среды, посуда, материалы

5.1 При проведении микробиологических анализов органических удобрений используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду и материалы:

- анализатор потенциометрический для контроля pH, обеспечивающий измерение с погрешностью до ±0,01 по ГОСТ 19881;
- баню водяную с терморегулятором, позволяющую поддерживать температуру от 20 °С до 100 °С с отклонением 1 °С от заданной;
- весы по ГОСТ Р 53228 с максимальным пределом взвешивания 1000 г (типа ВЛР-1), с пределом допускаемой абсолютной погрешности взвешивания ± 10 мг;
- весы по ГОСТ Р 53228 с максимальным пределом взвешивания 160 г (типа ВЛКТ-160), с пределом допускаемой абсолютной погрешности взвешивания ± 5 мг;
- встряхиватель;
- гомогенизатор или смеситель лабораторный;
- дистиллятор электрический;
- шкаф ламинарный;
- микроскоп световой биологический с бинокулярной насадкой с увеличением 40—1000×;
- прибор нагревательный для варки сред из сухих препаратов, кипячения мембранных фильтров, расплавления питательного агара;
- плитку электрическую по ГОСТ 14919;
- прибор для счета колоний микроорганизмов типа СКМ-1;
- стерилизаторы паровые медицинские, соответствующие требованиям ГОСТ Р 51935;
- термометры ртутные электроконтактные ТПК по ГОСТ 9871;
- термометры жидкостные стеклянные с диапазоном температуры от 0 °С до 50 °С и от 50 °С до 100 °С по ГОСТ 28498;
- стерилизатор электрический суховоздушный типа серии АТ, позволяющий поддерживать температуру от 20 °С до 50 °С с отклонением до 0,5 °С от заданной по ГОСТ 22649;
- холодильник портативный (типа ХАТЭ-12) или термоконтейнер с емкостями для горячей воды или льда;
- холодильник электрический бытовой, любого класса (SN, N, ST/T), позволяющий поддерживать температуру не более 5 °С, по техническим характеристикам и условиям эксплуатации соответствующий требованиям ГОСТ 16317;
- шкаф сушильный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С по ГОСТ Р 51564;
- колбы широкогорлые специальные для стерилизации и хранения питательных сред из термостойкого стекла вместимостью 500 $см^3$ с герметично завинчивающимися крышками;
- банки стеклянные с притертыми пробками разной вместимости до 1000 $см^3$;
- бюретки по ГОСТ 29251;
- кастрюли разной вместимости по ГОСТ 17151;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29227;

- посуду лабораторную стеклянную (стаканы, воронки, стеклянные палочки, чашки Петри, цилиндры, колбы, чашки лабораторные, спиртовки, пробирки) по ГОСТ 23932, ГОСТ 25336;
- посуду мерную лабораторную стеклянную (цилиндры с носиком, мензурки, колбы, пробирки и пр.) различной вместимости по ГОСТ 1770;
- промывалки;
- флаконы вместимостью 100—200 $см^3$;
- чашки, стаканы фарфоровые, ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147;
- бюксы металлические, стеклянные;
- брезент по ГОСТ 15530;
- бумагу пергаментную по ГОСТ 1341;
- бумагу индикаторную;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;
- груши резиновые разных размеров;
- карандаши по стеклу (стеклографы);
- маркеры по стеклу;
- тушь черную;
- лампу ультрафиолетовую с длиной волны 254 нм, типа БУФ-15, БУФ-30;
- линейки измерительные металлические по ГОСТ 427;
- лупы складные карманные по ГОСТ 25706;
- марлю по ГОСТ 9412;
- мешки полиэтиленовые по ГОСТ 17811;
- ножницы анатомические по ГОСТ 19126;
- ножницы хирургические по ГОСТ 21239;
- пакеты полиэтиленовые по ГОСТ Р 50962;
- перчатки резиновые;
- петли бактериологические;
- пинцеты, скальпели анатомические по ГОСТ 21241;
- пластины асбестоцеллюлозные фильтрующие и стерилизующие по ГОСТ 480;
- полиэтиленовую пленку по ГОСТ 10354;
- прибор для окраски предметных стекол или ванночку эмалированную с мостиком;
- пробки (силиконовые, ватно-марлевые, резиновые) конусные, выдерживающие стерилизацию сухим жаром;
- сита почвенные с размером диаметра ячеек 0,5; 0,25 и 0,3 $мм^2$;
- спички по ГОСТ 1820;
- стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
- стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
- стекло медицинское по ГОСТ 19808;
- фартук клеенчатый;
- фильтры мембранные со средним размером диаметра пор 0,5 мкм и планктонные с размером диаметра пор 3—5 мкм, диска — 35 мм;
- фильтры обеззоленные;
- часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145;
- шпагат по ГОСТ 17308;
- шпатели пластмассовые и металлические по ГОСТ 19126;
- штатив для пробирок.

5.2 При проведении микробиологических анализов органических удобрений используют следующие реактивы:

- α-Нафтиламин;
- алюминий сернокислый 18-водный по ГОСТ 3758;
- аммиак водный по ГОСТ 3760;
- аммоний сернокислый по ГОСТ 3769;
- аммоний хлористый по ГОСТ 3773;
- аргинин гидрохлорид;
- аспарагин;
- бенгальский розовый;
- бромтимоловый синий по ГОСТ 4919.1;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

- вода питьевая по [3], [4];
- глицерин по ГОСТ 6259;
- D-глюкоза по ГОСТ 6038;
- дрожжи кормовые по ГОСТ 20083;
- дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171;
- железо (II) сернокислое 7-водное по ГОСТ 4148;
- железо (III) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- калия гидроокись по ГОСТ 24363;
- казеин технический по ГОСТ 17626;
- калий азотистокислый по ГОСТ 4144;
- калий азотнокислый по ГОСТ 4217;
- калий йодистый по ГОСТ 4232;
- калий лимоннокислый 1-водный по ГОСТ 5538;
- калий сернокислый по ГОСТ 4145;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493;
- калий-натрий виннокислый по ГОСТ 5845;
- кальций лимоннокислый;
- кальций углекислый по ГОСТ 4530;
- кальций хлористый технический по ГОСТ 450;
- карбамид по ГОСТ 6691;
- кислоту борную по ГОСТ 9656;
- кислоту молочную пищевую по ГОСТ 490;
- кислоту лимонную по ГОСТ 3652;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118;
- кислоту сульфаниловую по ГОСТ 5821;
- кислоту уксусную по ГОСТ 61;
- крахмал растворимый по ГОСТ 10163;
- магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523;
- магний углекислый основной водный по ГОСТ 6419;
- Д (-) манит, ч. д. а;
- марганец (II) сернокислый 5-водную по ГОСТ 435;
- медь (II) сернокислую 5-водную по ГОСТ 4165;
- мел химический осажденный по ГОСТ 8253;
- натрий азотнокислый технический по ГОСТ 828;
- натрия бромид;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- натрий двууглекислый по ГОСТ 2156;
- натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280;
- натрий молибденовокислый 2-водный по ГОСТ 10931;
- натрий серноватистокислый (натрия тиосульфат) 5-водный по ГОСТ 27068;
- натрий углекислый по ГОСТ 83;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрий яблочнокислый (малат натрия 1-замещенный);
- нитрит натрия технический по ГОСТ 19906;
- пептон сухой ферментативный для бактериологических целей ГОСТ 13805;
- перекись водорода по ГОСТ 10929;
- реактив Грисса;
- реактив Несслера по ГОСТ 4517;
- сахарозу по ГОСТ 5833;
- сусло семибаллинговое;
- спирт этиловый ректификованный пищевой по ГОСТ Р 51652;
- стрептомицин;
- цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174;
- цинк хлористый по ГОСТ 4529;
- цинка йодид.

5.3 При проведении микробиологических анализов органических удобрений используют следующие культуральные среды:

- автолизат кормовых дрожжей;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- агар питательный сухой;
- бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730.

5.4 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов, культуральных сред, по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Приготовление сред и реактивов

6.1 Питательные среды приготавливают и стерилизуют в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 11133-1, ГОСТ ISO 11133-2.

6.2 Питательный агар из сухого препарата промышленного производства по ГОСТ 17206 готовят по способу, указанному на этикетке в соответствии с ГОСТ 10444.1.

6.3 Мясо-пептонный агар (МПА) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

6.4 Мясо-пептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730, ГОСТ 29112 готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1.

6.5 Вода пептонная

Состав (в граммах на 1 дм^3 водопроводной воды): пептон — 5,0; K_2HPO_4 — 1,0; KH_2PO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5.

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу по ГОСТ 25336 помещают 1 дм^3 водопроводной воды, вносят 5 г пептона и кипятят в течение 15 мин. В горячую жидкость вносят соли. Доводят pH до 7,0 по ГОСТ 10444.1. После растворения солей раствор тщательно взбалтывают и фильтруют до полной прозрачности. Фильтрат собирают в коническую колбу, химический стакан по ГОСТ 25336.

Среду разливают в пробирки по 6 см^3 и стерилизуют в автоклаве в течение 25 мин при давлении 101,3 кПа.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.6 Среда Федорова

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): K или Na — виннокислый или Na яблочнокислый — 5,0; мочевина — 50,0; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2.

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу по ГОСТ 25336 помещают 1 дм^3 водопроводной воды. Вносят соли, кроме мочевины. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. В стерильную среду добавляют раствор мочевины, предварительно пропущенный через бактериальный фильтр. Среду разливают по 30 см^3 в конические колбы.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.7 Среда Зенгена

Состав (в граммах на 1 дм^3 водопроводной воды): мочевина — 30; K_2HPO_4 — 0,5; лимоннокислый кальций — 10. pH среды — около 7,0.

Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Мочевину стерилизуют отдельно сухим жаром при температуре 106 °С в течение 30 мин и затем вводят в стерильную среду.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.8 Агар крахмало-аммиачный (КАА)

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0; NaCl — 1,0; $CaCO_3$ — 3,0; крахмал растворимый — 10,0; агар — 20,0.

Крахмал предварительно растворяют в 50 см^3 дистиллированной воды и приливают к основной среде до стерилизации. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.9 Среда крахмало-казеиновая

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): крахмал растворимый — 10,0; казеин — 0,3; KNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; NaCl — 2,0; $CaCO_3$ — 0,02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; агар — 20,0.

Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 111 °С, давлении 50,7 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.10 Агар глицерино-аргининовый

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): глицерин — 12,5; аргинин — 1,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; NaCl — 1,0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,001; агар — 20,0.

Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 111 °С, давлении 50,7 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.11 Сусло-агар

Семибаллинговое сусло разводят дистиллированной водой в соотношении 1:3 и добавляют 2 %-ный агар. Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 30 мин. Перед посевом в 1 дм^3 среды добавляют 2 см^3 стерильной молочной кислоты или 0,5 г стерильной лимонной кислоты.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.12 Среда Чапека

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): $NaNO_3$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; KCl — 0,5; $FeSO_4$ — следы; сахароза — 20,0; агар — 20,0.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 30 мин. Перед посевом в 1 дм^3 среды добавляют 4 см^3 стерильной молочной кислоты.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.13 Среда Мартина

Состав (в граммах на 1 дм^3 водопроводной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; пептон — 5,0; глюкоза — 10,0; бенгальский розовый — 0,15 мг; агар — 20,0.

Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 30 мин.

После стерилизации перед разливом в расплавленную среду вносят стрептомицин 0,5 г/дм^3.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.14 Среда Гетчинсона

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,3; $CaCl_2$ — 0,1; NaCl — 0,1; $FeCl_3$ — 0,01; $NaNO_3$ — 2,5; агар — 20,0. pH среды — 7,2—7,3.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.15 Среда Виноградского

Состав (в граммах на 1 дм^3 водопроводной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; агар — 20,0.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике —не более 5 дней.

6.16 Среда Омелянского

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0; NaCl — 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0; $CaCO_3$ — 2,0; фильтровальная бумага — 30,0.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.17 Среда жидкая Виноградского

Состав среды для первой фазы в процентах: $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2; K_2HPO_4 — 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; NaCl — 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,04; $CaCO_3$ или $MgCO_3$ — 0,5.

Состав среды для второй фазы в процентах: $NaNO_2$ — 0,1; Na_2CO_3 (безводный) — 0,1; NaCl — 0,05; K_2HPO_4 — 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,04.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.18 Среда для учета гетеротрофных нитрификаторов

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): сухой питательный агар — 3,5; агар — 13,5; $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5. pH среды — 7,0—7,2.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.19 Жидкая среда Гильтая

Готовят два раствора.

Первый раствор: 2,0 г KNO_3, 1,0 г аспарагина растворяют в 250 $см^3$ дистиллированной воды.

Второй раствор: 5 г натрия лимоннокислого, 2,0 г KH_2PO_4, 2,0 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ и $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (следы) растворяют в 500 $см^3$ дистиллированной воды.

Оба раствора сливают в коническую колбу по ГОСТ 25336 и доводят объем среды до 1000 $см^3$. Устанавливают pH 7 по индикатору бромтимоловому синему, который добавляют в среду. Цвет среды зеленый. Среду разливают высоким слоем (до 2/3 объема) по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при давлении 50,7 кПа, температуре 112 °С в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.20 Среда Березовой

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): цитрат калия или натрия — 2,0; KNO_3 — 1,0; KH_2PO_4 — 1,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 2,0 г; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,2г; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — следы (1 $см^3$ 1 %-ного раствора на 1 $дм^3$ среды).

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 10 дней.

6.21 Агар нитритный, приготовленный по методу Виноградского

Состав среды (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): $NaNO_2$ — 1,0; Na_2CO_3 (безводный) — 1,0; NaCl — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; агар — 20 г.

Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 10 дней.

6.22 Среда синтетическая безазотистая

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): сахароза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl, $FeSO_4$, $MnSO_4$ — следы.

Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Перед посевом добавляют 1 $см^3$ стерильной дрожжевой воды и 20 г стерильного мела.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 10 дней.

6.23 Среда Емцева

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): NaH_2PO_4 — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,01; глюкоза — 20,0; мел — 10,0; смесь микроэлементов по Федорову — 1,0 $см^3$; пептон — 5,0; дрожжевой автолизат — 0,2 $см^3$. pH среды — 7,0.

Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

6.24 Среда жидкая Бейеринка

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): маннит или Д-глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $CaCO_3$ — 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; 1 $см^3$ смеси микроэлементов по Федорову.

Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.25 Среда плотная Эшби

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): маннит — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0; смесь микроэлементов по Федорову — 1 $см^3$; агар — 20,0 г.

Среду стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 30 мин.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 10 дней.

6.26 Реактив Несслера — по ГОСТ 4517.

Срок хранения среды — не более 6 мес; в холодильнике — не более 10 дней.

6.27 Раствор Люголя — по ГОСТ 10444.1.

6.28 Цинк-йод-крахмал — по ГОСТ 4517.

6.29 Состав микроэлементов по Федорову

Состав (в граммах на 1 $дм^3$ дистиллированной воды): H_3BO_3 — 5,0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 5,0; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 3,0; KI — 0,5; NaBr — 0,5; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ — 0,3.

Срок хранения среды —не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

6.30 Вода дрожжевая

100 г дрожжей растворяют в 1 дм^3 воды, кипятят 10 мин, фильтруют, стерилизуют при давлении 50,7 кПа в течение 10 мин. После стерилизации в среду добавляют 20 г стерильного мела на 1 дм^3 среды. Мел стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин.

Срок хранения среды — не более 2 мес; в холодильнике — не более 5 дней.

Примечание — Все используемые среды хранят в сухих, защищенных от прямого солнечного света помещениях при температуре от 2 °С до 25 °С в специальных для стерилизации и хранения питательных сред широкогорлых колбах из термостойкого стекла вместимостью 500 см^3 с герметично завинчивающимися крышками либо в холодильнике в колбах, снабженных ватными пробками, при температуре от 2 °С до 5 °С.

6.31 Бромтимоловый синий — по ГОСТ 4919.1, ГОСТ 10444.1.

6.32 Соль аммонийно-магниево-фосфорнокислая

Готовят два раствора.

Первый раствор: в 200 см^3 дистиллированной воды растворяют 25,0 г хлористого аммония (NH_4Cl) и 20 г сернокислого магния ($MgSO_4 \cdot 7H_4O$).

Второй раствор: в 100 см^3 дистиллированной воды растворяют 10 г однозамещенного фосфорнокислого натрия (NaH_2PO_4).

Оба раствора смешивают и прибавляют 20 см^3 насыщенного хлористого аммония. Прибавляют по каплям концентрированный аммиак до образования сильного устойчивого запаха. Через 10 мин фильтруют через бумажный фильтр, промывают дистиллированной водой до исчезновения запаха. Высушивают на воздухе и аммонийно-магниево-фосфорнокислую соль развешивают в пакетики по 0,8 г.

6.33 Реактив Грисса — по ГОСТ 4517 со следующим дополнением.

Первый раствор состоит из 0,5 г сульфаниловой кислоты, растворенной в 30 см^3 ледяной уксусной кислоты. Добавляют 100 см^3 дистиллированной воды и фильтруют.

Срок хранения раствора в холодильнике при 4 °С — 5 °С — не более одного месяца.

Второй раствор: 0,1 г α-нафтиламина растворяют в 100 см^3 кипящей дистиллированной воды. Охлаждают и добавляют 30 см^3 ледяной уксусной кислоты. Раствор фильтруют.

Срок хранения раствора в холодильнике при 4 °С — 5 °С — не более одной недели.

Непосредственно перед употреблением смешивают равные объемы данных растворов.

6.34 Приготовление стерильной воды — по ГОСТ 18963.

6.35 Приготовление стерильного кальция углекислого — по ГОСТ 10444.1.

6.36 Водный агар

Состав (в граммах на 1 дм^3 дистиллированной воды): агар — 20,0.

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу по ГОСТ 25336 помещают 1 дм^3 водопроводной воды, вносят 20 г микробиологического агар-агара.

Среду стерилизуют 30 мин в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа.

Срок хранения среды — не более 3 мес; в холодильнике — не более 7 дней.

7 Отбор и подготовка проб

Отбор проб органических удобрений — по ГОСТ Р 54519.

8 Подготовка к проведению анализа

8.1 Подготовку лабораторных помещений, стерилизацию посуды, инструментов, питательных сред, физиологических растворов проводят по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO 11133-1, ГОСТ ISO 11133-2.

Длительность и температура стерилизации определяются составом питательной среды, химическим составом материала и целью анализа (см. приложения Б, В).

8.2 Приготовление разведений, посев и учет микроорганизмов

8.2.1 Лабораторную пробу твердых органических удобрений из пакета выкладывают на стерильную полиэтиленовую пленку, тщательно перемешивают шпателем, удаляя при этом посторонние включения (камни, стекла и т. д.), разравнивают тонким слоем и из разных мест отбирают 10 г анализируемой пробы. При анализе жидких или полужидких органических удобрений лабораторную пробу тщательно перемешивают и отбирают 10 см^3 пробы для анализа.

8.2.2 Анализируемую пробу переносят в колбу со 100 см^3 стерильной водопроводной воды. Параллельно отбирают анализируемые пробы для определения влажности в металлические или стек-

лянные бюксы. Колбы с органическим удобрением помещают на механическую качалку и встряхивают в течение 15 мин, предварительно заменив ватные пробки на резиновые. По окончании встряхивания приступают к проведению микробиологического анализа, который включает: приготовление разведений, проведение посева и учет количества колоний.

8.2.3 Разведение готовят в стерильной водопроводной воде или в физиологическом растворе (0,85 %-ный раствор NaCl по ГОСТ 4233), используя постоянный коэффициент разведения, чаще всего равный 10. Разведение осуществляют в ряде пробирок, содержащих по 9 $см^3$ воды.

Количество разведений подбирается опытным путем с учетом вида органического удобрения. Колбу с суспензией встряхивают и оставляют на 30 сек для оседания крупных частиц. Стерильной пипеткой отбирают 1 $см^3$ суспензии (не прикасаясь ко дну колбы), переносят ее в пробирку с водой (9 $см^3$). Суспензию в первой пробирке тщательно перемешивают другой стерильной пипеткой, для чего в пипетку забирают и вновь возвращают в пробирку ее содержимое. Данная операция по перемешиванию суспензии микроорганизмов повторяется не менее 10 раз. Аналогичным образом готовят все последующие разведения, 1 $см^3$ суспензии в колбе соответствует разведению 10^{-1}, в первой пробирке — 10^{-2} и так далее. Пробирки и колбы обычно подписывают заранее двумя цифрами, написанными одна под другой. Верхняя цифра обозначает номер образца, нижняя — степень разведения (см. приложение Г).

8.2.4 При планировании посева на большое количество питательных сред 9 $см^3$ суспензии будет недостаточно. В этом случае ряд разведений готовят в колбах или бутылках вместимостью 250 $см^3$ с 90 $см^3$ стерильной водопроводной воды. Из первой и последующих колб берут по 10 $см^3$ суспензии. Для приготовления каждого разведения используют новую пипетку. Бутылки встряхивают 1 мин. Использованные пипетки помещают в фарфоровую кружку, на дно которой кладут вату и наливают немного воды. Все операции проводят при зажженной газовой горелке или спиртовке.

8.2.5 Высевают суспензию поверхностным или глубинным способом на плотные и жидкие питательные среды. Посев проводят в боксах, ламинарных шкафах, оборудованных ультрафиолетовыми лампами, с соблюдением условий асептики. Набор сред зависит от задач бактериологического анализа органических удобрений. Расплавленную и охлажденную до температуры 45 °С — 50 °С агаризованную среду разливают в чашки Петри по 15—20 $см^3$ в каждую.

Чашки должны находиться на горизонтальной поверхности, чтобы получился ровный слой застывшей среды. Чашки помещают в предварительно протертый 70 %-ным этиловым спиртом и нагретый до температуры 65 °С —70 °С сушильный шкаф на 15 — 20 мин. В сушильном шкафу чашки Петри переворачивают вверх дном, открывают и ставят под углом 45° на крышку и подсушивают для удаления конденсационной воды до появления муарового рисунка на поверхности среды. Развившиеся колонии микроорганизмов на таких чашках не расплываются и не сольются друг с другом.

Тщательно перемешав суспензию в пробирке или бутылке, стерильной пипеткой на поверхность среды наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 $см^3$) соответствующего разведения, затем быстро и тщательно растирают его стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности среды. Посев обычно осуществляют из двух или трех последовательных разведений в целях проведения более точного подсчета количества микроорганизмов в органическом удобрении. Из каждого разведения засевают по три – пять параллельных чашек. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки переворачивают крышками вниз и инкубируют в термостате при определенной температуре необходимое время.

8.2.6 При глубинном посеве 0,5 или 1 $см^3$ суспензии из соответствующего разведения переносят пипеткой в три—пять стерильных чашек Петри, затем заливают расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С — 50 °С средой и смешивают с посевным материалом легким вращательным движением. После застывания чашки помещают в термостат.

8.2.7 После прохождения необходимого срока инкубации чашки вынимают из термостата и подсчитывают число выросших колоний. Для правильного определения численности клеток подсчитывают только такие чашки, в которых выросло колоний свыше десяти и не более 250—300. Закрытые чашки просматривают в проходящем свете и отмечают колонии тушью или маркером по стеклу. Для удобства дно чашки с помощью линейки и маркера делят на секторы. Подсчет колоний на непрозрачных средах (почвенный агар) проводят непосредственно с поверхности. Для подсчета колоний используют специальные полуавтоматические счетчики. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой.

8.2.8 Все количественные подсчеты на агаризованных средах необходимо проводить всегда через одно и то же время после посева, чтобы получить сравнимые результаты.

Количество клеток M, в 1 см^3 анализируемого субстрата, вычисляют по формуле

$$M = \frac{a \cdot 10n}{V}, \quad (1)$$

где a — среднее число колоний при посеве данного разведения;

10 — коэффициент разведения;

n — порядковый номер разведения, из которого сделан посев;

V — объем суспензии, взятой для посева по 8.3.5, 8.3.6, см^3.

Полученное количество клеток соответствует содержанию микроорганизмов в 1 г сырого субстрата.

Для пересчета на 1 г абсолютно сухого субстрата необходимо полученные результаты умножить на коэффициент пересчета, который вычисляют по формуле

$$K = \frac{100}{100 - W}, \quad (2)$$

где W — влажность субстрата, %.

8.2.9 Наиболее вероятное количество микроорганизмов *Mprob*, содержащееся в 1 г исходного субстрата, при уровне достоверности $P = 0{,}95$ вычисляют по формуле

$$Mprob = \overline{X} \pm 2\sigma_{\overline{X}} \cdot K\frac{1}{V}, \quad (3)$$

где $\overline{X} = \frac{\Sigma X}{n}$ — среднее число колоний, выросших из данного разведения;

ΣX — общее число подсчитанных колоний при посеве данного разведения;

n — число повторностей;

$\sigma_{\overline{X}} = + \frac{\sqrt{\Sigma X}}{n}$ — среднеквадратическое отклонение;

2 — критерий (t) при $P = 0{,}95$;

K — разведение, из которого проведен посев;

V — объем суспензии, взятый для посева, см^3.

Если уровень достоверности составляет 99 %, то (t) — критерий равен 2,7.

8.2.10 Для учета микроорганизмов, которые плохо или совсем не развиваются на плотных питательных средах, используют посев в жидкие среды (метод предельных разведений). Этот метод применяют также при определении численности бактерий разных физиологических групп (денитрифицирующие, азотфиксирующие и др.).

В пробирки с жидкой средой вносят измеренный объем посевного материала (1 см^3) из различных разведений. Посев проводят из каждого разведения или четырех—пяти последних, высевая в три—пять параллельных пробирок. Посев одной пробы можно выполнять одной стерильной пипеткой, начиная с большего разведения. Время инкубации колеблется от 3 до 10 сут и зависит от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяют. При этом отмечают плюсом (+) пробирки с разведениями, в которых развились представители данной группы, а минусом (–) — его отсутствие. В жидких средах о развитии микробов разных групп судят по помутнению среды, образованию осадка, пленки, пузырьков газа, изменению окраски и т. д.

8.2.11 В целях более точного подсчета используют таблицу Мак-Креди, составленную на основании обработки многочисленных результатов методом вариационной статистики (см. приложение Д). Необходимо составить числовую характеристику из трех цифр. Первая цифра отвечает числу параллельно засеянных пробирок (отмечается последнее разведение, в котором рост микроорганизмов наблюдается во всех параллельных пробирках). Следующие две цифры обозначают число пробирок, где происходит развитие микроорганизмов в последующих двух разведениях.

8.2.12 По таблице Мак-Креди находят вероятное число клеток, соответствующее числовой характеристике, и умножают на степень разведения, при которой отмечен рост во всех параллельных пробирках. При пересчете на 1 г абсолютно сухого субстрата полученный результат умножают на коэффициент, рассчитанный по формуле (2).

Пример

Числовая характеристика составляет 321; вероятное число клеток 15, которое умножаем на 10000. Если влажность органического удобрения равна 72 %, то умножаем на коэффициент 3,57.

Число клеток в 1 г абсолютно сухого органического удобрения равно:

$$15 \cdot 10000 \cdot 3{,}57 = 535500.$$

Расчет

Разведение	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Число параллельно засеянных пробирок	***3***	***3***	***3***	***3***	***3***
Число пробирок, в которых обнаружен рост	***3***	***3***	***2***	***1***	***0***

Статистическая обработка результатов микробиологических анализов проводится в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10576-1.

8.2.13 Схема микробиологического анализа органических удобрений приведена в приложении Д.

9 Методы микробиологического анализа органических удобрений

9.1 Метод выявления микроорганизмов-аммонификаторов, использующих органические формы азота

9.1.1 Наиболее активно в процессах аммонификации участвуют представители бактерий родов Pseudomonas, Bacillus, Clostridium и Proteus, представители грибов порядка Mucorales, родов Aspergillus, Trichoderma и др.

9.1.2 Типичные аммонификаторы выявляют посевом из соответствующего разведения (четыре—пять) на мясо-пептонном агаре (МПА) по 6.3 или мясо-пептонном бульоне (МПБ) по 6.4. Для выявления аммонифицирующих бактерий также можно использовать пептонную воду по 6.5.

9.1.3 Численность аммонификаторов определяют методом предельных разведений. О развитии аммонифицирующих бактерий судят по помутнению среды и появлению на поверхности пленки. Учет проводят на третьи—пятые—седьмые сутки.

9.1.4 В целях более точной оценки аммонифицирующей активности бактерий анализируют выделение аммиака (NH_3). Аммиак выявляют в атмосфере и субстрате. Выделяющийся NH_3 окрашивает подвешенную в пробирке красную лакмусовую бумажку в синий цвет. Накопление NH_3 в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера по ГОСТ 4517. На фарфоровую пластинку с лунками или предметное стекло помещают каплю субстрата, затем вносят каплю реактива Несслера. При большом количестве NH_3 образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом — оранжевая или желтая окраска.

9.1.5 Бактерии, способные к аммонификации мочевины, — уробактерии, выявляют по выделению аммиака на средах, содержащих мочевину, среде Федорова по 6.6, среде Зенгена по 6.7. Численность уробактерий определяют методом предельных разведений. Посевы проводят из соответствующих разведений и инкубируют в термостате при температуре 25 °С — 30 °С. Через три—пять суток устанавливают выделение аммиака в соответствии с 9.1.4.

Среду Зенгена разливают в пробирки по 6 $см^3$. Посев проводят из разведений $1:10^3$ — $1:10^9$. Культивирование происходит в течение пяти—семи суток в термостате при температуре 25 °С — 30 °С. О содержании уробактерий судят по помутнению среды и появлению на поверхности пленки.

9.2 Метод выявления микроорганизмов, использующих минеральные формы азота

9.2.1 Группа микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, представлена в основном бактериями и актиномицетами.

9.2.2 Бактерии и актиномицеты выявляют на крахмало-аммиачном агаре (КАА) по 6.8. Посев проводят из четвертого—пятого разведений по 0,05 $см^3$ на поверхность среды. Инкубируют в термостате при температуре 28 °С, на четвертые—пятые сутки подсчитывают только бактериальные колонии, а на седьмые—десятые подсчитывают актиномицеты. Отмечают окраску колоний (желтый, розовый, черный), воздушного мицелия (серый, белый, желтовато-серый, розовый) и среды (выделение пигмента в субстрат).

9.2.3 При идентификации актиномицетов описывают консистенцию колоний (плотные, кожистые, рыхлые), поверхность (мучнистая, бархатистая) и запах (землистый, эфирный, фруктовый).

Актиномицеты выделяют также на крахмало-казеиновой среде по 6.9 на глицерино-аргининовом агаре по 6.10.

На данных средах, как правило, вырастают колонии актиномицетов, принадлежащих к родам Streptomyces, Streptoverticellum, Chainia. Представители этих родов являются аэробными, грамположительными микроорганизмами. Они образуют разветвленный мицелий, обычно 0,5—2,0 мкм в диаметре,

который подразделяется на первичный, или субстратный, и вторичный, или воздушный, споры неподвижны, образуются в виде цепочек на специальных спороносящих гифах воздушного мицелия.

9.3 Метод выявления микроскопических грибов

9.3.1 Микроскопические грибы чаще обнаруживают на сусле-агаре по 6.11 на кислой среде Чапека по 6.12 или среде Мартина по 6.13 с добавлением бенгальского розового. Перед посевом в сусло-агар добавляют 2 $см^3$ стерильной молочной кислоты или 0,5 г лимонной кислоты. Перед посевом в среду Чапека добавляют 4 $см^3/дм^3$ стерильной молочной кислоты. Среду разливают в чашки, тщательно перемешивая покачиванием. Добавление кислот и других ингибиторов производится асептически в стерильные охлажденные до температуре 45 °С — 50 °С питательные среды.

9.3.2 Количество микроскопических грибов чаще учитывают методом глубинного посева 1 $см^3$ суспензии из трех—четырех разведений в стерильные чашки Петри. Инкубируют при температуре 26 °С — 28 °С, количество грибов учитывают на четвертые—пятые сутки.

9.4 Метод выявления целлюлозоразрушающих микроорганизмов

9.4.1 Из бактерий, интенсивно разлагающих целлюлозу в органических удобрениях, наиболее часто встречаются представители родов Cytophaga, Cellvibrio, Cellfalcicula, Polyangium и Sorangium.

9.4.2 Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы хорошо выявляются на среде Гетчинсона по 6.14 и среде Виноградского по 6.15.

9.4.3 На застывшую среду в чашки Петри помещают стерильный обеззоленный фильтр, засевают суспензию по 1 $см^3$ из третьего—четвертого разведения, растирают стерильным шпателем. Инкубируют в термостате при температуре 28 °С. Учет проводят на десятые сутки. На бумаге вырастают отдельные колонии плесневых грибов, актиномицетов и бактерий. Подсчитывают количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г органического удобрения.

9.4.4 Из грибов, наиболее интенсивно разлагающих целлюлозу в органических удобрениях, наиболее часто встречаются представители родов Dematium, Stachybotris, Cladosporium, Chaetomium, Fumago.

9.4.5 Количественный учет аэробных целлюлозоразрушающих бактерий проводят также методом предельных разведений. Посев из разведений органического удобрения производят в пробирки с жидкой средой Гетчинсона по 6.14 с полосками фильтровальной бумаги. О развитии целлюлозоразлагающих бактерий судят по разрушению полосок фильтровальной бумаги и образованию колоний.

9.4.6 В условиях ограниченного доступа воздуха целлюлозу разлагают в основном представители рода Clostridium, например Cl. omelianskii, представляющий длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце.

9.4.7 Анаэробные бактерии, разлагающие целлюлозу, выявляют на среде Омелянского по 6.16. Жидкую питательную среду разливают высоким слоем в высокие пробирки вместимостью 20—25 $см^3$, фильтровальную бумагу в виде полосок опускают на дно пробирки.

9.4.8 Посев проводят из разведений в несколько параллельных пробирок, которые инкубируют в термостате при температуре 30 °С. Учет проводят методом предельных разведений на пятые—седьмые сутки по помутнению среды.

9.5 Метод выявления нитрифицирующих бактерий

9.5.1 Первую фазу нитрификации ($NH_4^+ + 1^1/_2O_2 = NO_2^- + 2H + H_2O$) осуществляют в основном бактерии рода Nitrozomonas, вторую фазу ($NO_2^- + {}^1/_2O_2 = NO_3^-$) — Nitrozobacter.

Первую и вторую фазы нитрификации можно наблюдать в жидких средах Виноградского по 6.17.

9.5.2 Среды инокулируют из соответствующих разведений органических удобрений. Численность нитрифицирующих бактерий определяют методом предельных разведений. Инкубируют при температуре 25 °С — 30 °С в течение трех—четырех недель. О развитии судят по изменению состава среды. Через неделю после посева при изучении первой фазы нитрификации устанавливают образование азотистой кислоты (капельная реакция с реактивом Грисса или цинк-йод-крахмалом в кислой среде). В присутствии азотистой кислоты с реактивом Грисса по ГОСТ 4517 образуется красное окрашивание, с цинк-йод-крахмалом — темно-синее окрашивание.

9.5.3 Для выявления нитрификаторов используют также аммонийно-магниево-фосфорнокислую соль по 6.32, которую растирают в стерильной ступке, растворяют в 2 $см^3$ дистиллированной воды и переносят на поверхность водного агара чашки Петри. Засевают по 1 $см^3$ суспензии из третьего—четвертого разведения, тщательно перемешивают круговыми движениями до равномерного распределения соли. Инкубируют в течение пяти—шести недель во влажной камере при комнатной температуре. Учет проводят по зонам растворения соли и пересчитывают на 1 г органического удобрения.

9.5.4 Оба раствора аммонийно-магниево-фосфорнокислой соли смешивают и прибавляют 20 $см^3$ насыщенного хлористого аммония. Затем приливают по каплям концентрированный аммиак до образования сильного устойчивого запаха. Оставляют на 10 мин, фильтруют через бумажный фильтр, промывают дистиллированной водой до исчезновения запаха. Высушивают на воздухе и развешивают в пакетики по 0,8 г.

9.5.5 Для учета гетеротрофных нитрификаторов суспензию из разведений органических удобрений высевают в чашки Петри на специализированную среду по 6.18. Посев инкубируют при комнатной температуре в течение пяти—десяти дней. Когда появляются отдельные бактериальные колонии, на них наносят по капле реактива Грисса по ГОСТ 4517. Покраснение указывает на образование нитратов из аммония, введенного в состав среды.

9.6 Метод выявления денитрифицирующих бактерий

9.6.1 Полную денитрификацию до образования газообразных продуктов проводят только прокариоты. Большинство их относится к родам Pseudomonas, Micrococcus и Bacillus. Денитрифицирующие бактерии определяют обычно на жидкой среде Гильтая по 6.19 или среде Березовой по 6.20.

9.6.2 Среду Гильтая наливают высоким слоем в пробирки вместимостью 20—25 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при давлении 50,7 кПа в течение 20 мин.

Среду Березовой наливают высоким слоем в пробирки вместимостью 20—25 $см^3$ и стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин.

9.6.3 Стерильную среду засевают из третьего—восьмого разведений, инкубируют в течение семи дней при температуре 25 °С — 30 °С. Среда в пробирках синеет, образуются пузырьки газов, от развившихся бактерий мутнеет. Численность денитрифицирующих бактерий определяют методом предельных разведений. Наблюдения проводят на третьи—пятые—седьмые сутки.

9.7 Метод выявления автохтонной микрофлоры

9.7.1 Из группы автохтонных микроорганизмов в органических удобрениях чаще всего встречаются представители родов Nocardia, Micromonospora, Bactoderma и Arthrobacter.

9.7.2 Представителей автохтонной микрофлоры выявляют на нитритном агаре, приготовленном по методу Виноградского по 6.21.

9.7.3 Посев проводят из четвертого—пятого разведения по 0,05 $см^3$ суспензии, инкубируют при температуре 26 °С — 28 °С в термостате в течение одной недели. Колонии учитывают под микроскопом при малом увеличении (окуляр $10^{\times}$, объектив $3^{\times}$ или окуляр $10^{\times}$, объектив $8^{\times}$).

9.7.4 Определяют площадь чашки Петри (P) и площадь поля зрения (p). Разделив площадь чашки на площадь поля зрения, получают коэффициент $K = P/p$, на который умножают среднее число колоний в поле зрения по чашке. В чашке учитывают не менее 50 полей зрения, затем выводят среднеарифметическое значение результатов на одно поле.

9.8 Метод выявления азотфиксирующих микроорганизмов (диазотрофов)

9.8.1 Среди свободноживущих азотфиксирующих бактерий наибольший интерес представляют виды родов Clostridium и Azotobacter.

9.8.2 Для учета Cl. pasteurianum используют синтетическую безазотистую среду по 6.22. Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Перед посевом добавляют 1 $см^3$ дрожжевой воды по 6.30. Среду энергично перемешивая, разливают в пробирки высоким слоем (до 2/3 объема пробирки).

9.8.3 Вносят в каждую пробирку 1 $см^3$ суспензии из второго, третьего, четвертого, пятого разведения. Наблюдения ведут по газообразованию на третьи—пятые—седьмые сутки. Пробирки инкубируют при температуре 28 °С — 30 °С. Признаками развития бактерий являются также помутнение среды и характерный запах масляной кислоты. Численность определяют методом предельных разведений.

9.8.4 Для учета Cl. pasteurianum используют среду Емцева по 6.23.

9.8.5 Посев и учет проводят по 9.8.3.

9.8.6 Наличие клостридиев в культуре определяют при микроскопировании препаратов «раздавленная капля» с раствором Люголя.

9.8.7 Для определения количества клеток аэробного азотофиксатора — Azotobacter chroococcum применяют метод предельного разведения, используя жидкую среду Бейеринка по 6.24.

9.8.8 Пробирки инкубируют при температуре 28 °С — 30 °С, учет проводят на пятые — седьмые сутки. При наличии азотобактера на поверхности среды образуется пленка.

9.8.9 Для учета азотобактера используют также посев на плотную среду Эшби по 6.25. Чашки инкубируют при температуре 28 °С — 30 °С в течение пяти—семи суток.

Приложение А
(справочное)

Состав дезинфицирующих растворов

Состав дезинфицирующих растворов приведен в таблице А.1.

Таблица А.1

Наименование микроорганизмов	Температура рабочего раствора, °С	Содержание в растворе, %		Соотношение компонентов для приготовления 10 дм^3 раствора		
		перекиси водорода	моющего средства	перекиси водорода, %, см^3	воды, см^3	моющего средства, г
Споровые формы	20	6	0,5	2400	7550	50
	30—40	3	0,5	1200	8750	50
Плесневые грибы	20	4	0,5	1600	8350	50
	30—40	2	0,5	800	9150	50
Вегетативные формы	20	3	0,5	1200	8750	50
	30—40	1	0,5	400	9550	50

Приложение Б
(справочное)

Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

Б.1 Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Наименование стерилизуемого материала	Метод стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
Питательные среды с почвенной вытяжкой, картофельные среды	Автоклавирование	Давление 151,95 — 202,6 кПа в течение 30 мин	В колбах, пробирках, бутылях и т. д., закрытых ватными пробками
Жидкие и агаризованные среды, не содержащие сахаров и других веществ, разлагающихся при температуре 120 °С	»	Давление 101,3 кПа в течение 20 мин	»
Жидкие и агаризованные среды с сахарами и другими соединениями, не выдерживающими нагревание до 120 °С	»	Давление 50,7 кПа в течение 15—30 мин	»
Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания выше 100 °С	Дробная стерилизация	Текучий пар, три раза по 30—40 мин через сутки	»
Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания, например белки, витамины, аминокислоты	Фильтрование через бактериальные фильтры	—	—
Вазелиновое масло, глицерин, тальк	Горячим воздухом	При температуре 160 °С в течение 2 ч или при температуре 170 °С в течение 1 ч	Слой вещества не должен превышать 1,5 см
Чашки Петри, пипетки, шпатели, колбы, пробирки, химические стаканы, флаконы, стеклянные центрифужные пробирки	То же	При температуре 160 °С — 170 °С в течение 2 ч	Завернуты в бумагу, отверстия пипеток закрыты ватными тампонами, другие сосуды закрыты ватными пробками
Мембранные фильтры	Автоклавирование	Давление 101,3 кПа в течение 15 мин	В сосуде с дистиллированной водой
Стеклянные фильтры, резиновые пробки и трубки	То же	Давление 101,3 кПа в течение 20 мин	В бумажной упаковке

Приложение В
(справочное)

Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от объема сосудов

В.1 Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от объема сосудов приведена в таблице В.1.

Таблица В.1

Наименование емкости	Вместимость	Время стерилизации при температуре 121 °С — 123 °С, мин
Пробирки	18 × 150 мм	12—14
	32 × 200 мм	13—17
	38 × 200 мм	15—20
Колбы тонкостенные	50 $см^3$	12—14
	125 $см^3$	12—14
	200 $см^3$	12—15
	500 $см^3$	17—22
	900 $см^3$	19—24
	1000 $см^3$	20—25
	1800 $см^3$	25—30
	2000 $см^3$	30—35
Колбы толстостенные	500 $см^3$	24—28
	1000 $см^3$	25—30
	2000 $см^3$	40—45
Матрацы	1000 $см^3$	30—35
Бутылки	200 $см^3$	15—20
	9000 $см^3$	50—55

Приложение Г
(справочное)

Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

Г.1 Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем (в соответствии с 8.3.1—8.3.6) приведена на рис. Г.1.

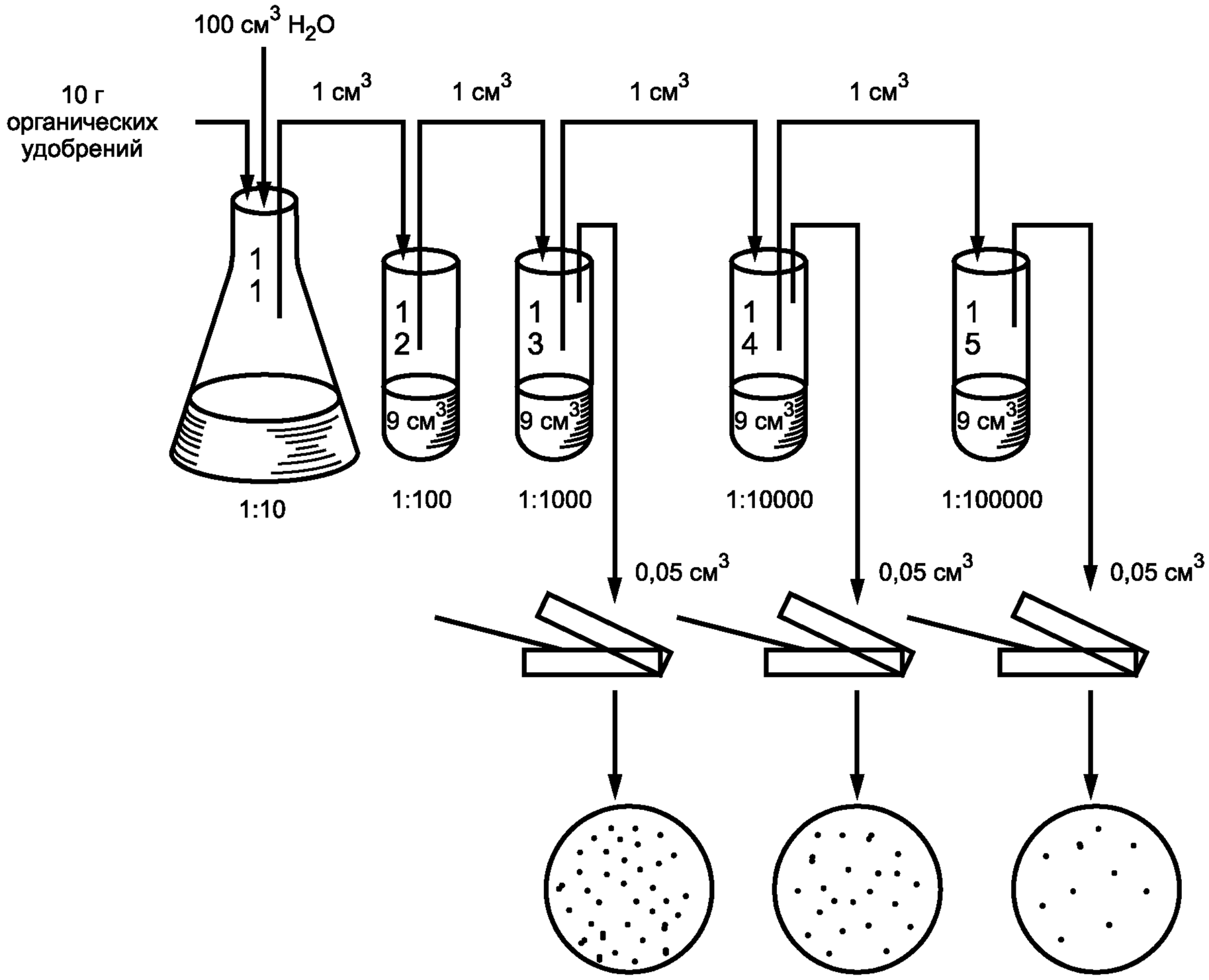

Рисунок Г.1

Приложение Д
(справочное)

Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди)

Д.1 Экспресс-обработка результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди) в соответствии с 8.3.11—8.3.12 приведена в таблице Д.1.

Таблица Д.1

Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок		
	3	4	5		3	4	5
300	2,5	1,1	0,8	422	—	13,0	3,0
301	4,0	1,6	1,1	423	—	17,0	—
302	6,5	2,0	1,4	424	—	20,0	—
303	—	2,5	—	430	—	11,5	2,5
310	4,5	1,6	1,1	431	—	16,5	3,0
311	7,5	2,0	1,4	432	—	20,0	4,0
312	11,5	3,0	1,7	433	—	30,0	—
313	16,0	3,5	2,0	434	—	35,0	—
320	9,5	2,0	1,4	440	—	25,0	3,5
321	15,0	3,0	1,7	441	—	40,0	4,0
322	20,0	3,5	2,0	442	—	70,0	—
330	25,0	3,0	1,7	443	—	140,0	—
331	45,0	3,5	2,0	444	—	160,0	—
332	110,0	4,0	—	450	—	—	4,0
333	140,0	5,0	—	451	—	—	5,0
340	—	3,5	2,0	500	—	—	2,5
341	—	4,5	2,5	501	—	—	3,0
350	—	—	2,5	502	—	—	4,0
400	—	2,5	1,3	503	—	—	6,0
401	—	3,5	1,7	504	—	—	7,5
402	—	5,0	2,0	510	—	—	3,5
403	—	7,0	2,5	511	—	—	4,5
410	—	3,5	1,7	512	—	—	6,0
411	—	5,5	2,0	513	—	—	8,5
412	—	8,0	2,5	520	—	—	5,0
413	—	11,0	—	521	—	—	7,0
414	—	14,0	—	522	—	—	9,5
420	—	6,0	2,0	523	—	—	12,0
421	—	9,5	2,5	524	—	—	15,0

Окончание таблицы Д.1

Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок			Числовая характеристика наличия микроорганизмов	Наиболее вероятное число микробов при заражении параллельных пробирок		
	3	4	5		3	4	5
525	—	—	17,5	543	—	—	30,0
530	—	—	8,0	544	—	—	35,0
531	—	—	11,0	545	—	—	45,0
532	—	—	14,0	550	—	—	25,0
533	—	—	17,5	551	—	—	35,0
534	—	—	20,0	552	—	—	60,0
535	—	—	25,0	553	—	—	90,0
540	—	—	13,0	554	—	—	100,0
541	—	—	17,0	555	—	—	180,0
542	—	—	25,0	—	—	—	—

Приложение Е
(справочное)

Схема оценки микробиологических характеристик органических удобрений

Е.1 Схема оценки микробиологических характеристик органических удобрений приведена на рисунке Е.1.

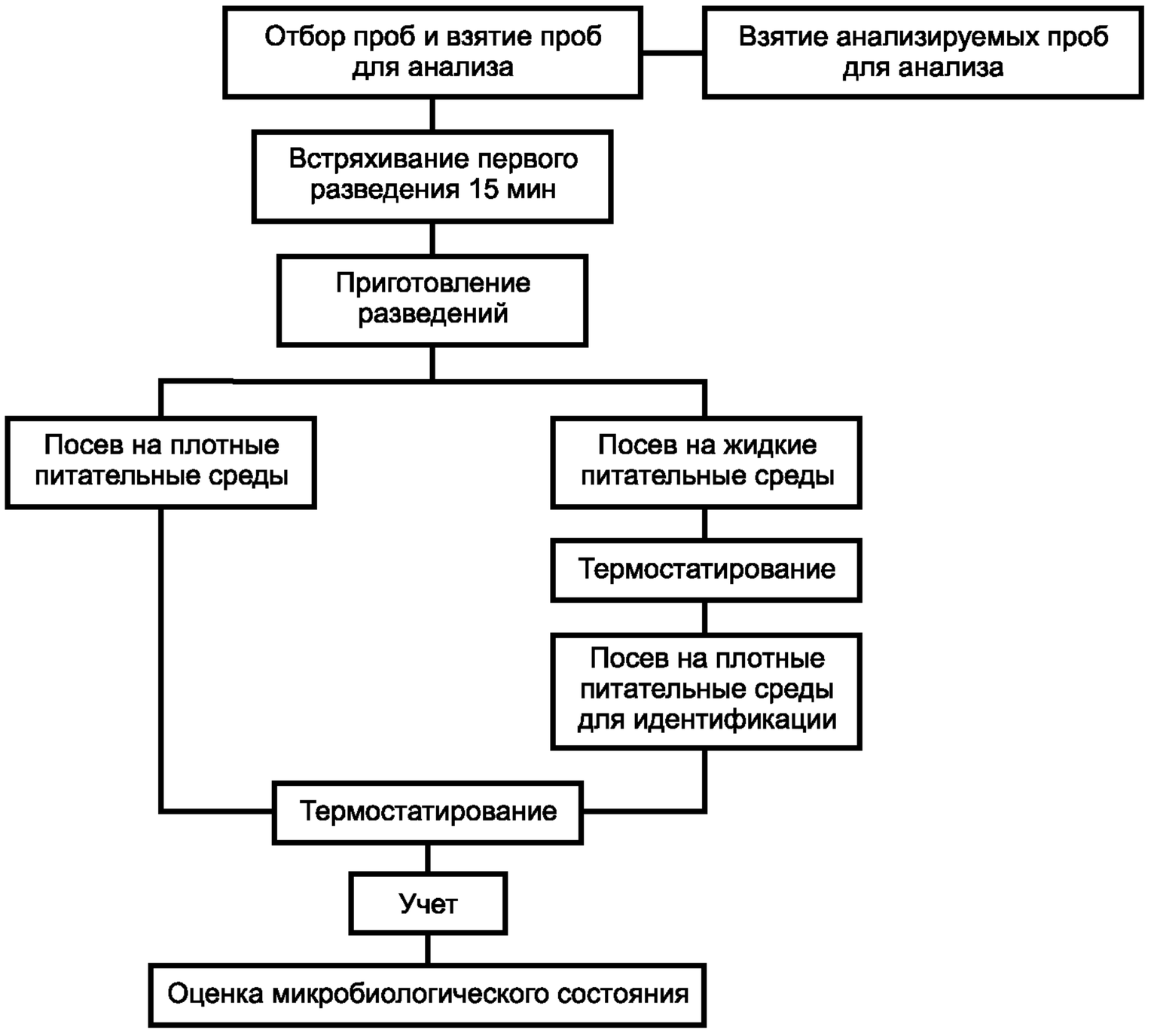

Рисунок Е.1

Библиография

[1] СП 1.2.036—95 — Санитарные правила. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмами III — IV групп патогенности

[2] СП 1.3.2322—2008 — Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней

[3] Сан ПиН 2.1.4.559—96 — Гигиенические требования и нормативы качества питьевой воды

[4] ГН 2.1.5.1315—2003 — Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования

УДК 631.86.354 ОКС 65.080 С19 ОКСТУ 9709, 9809

Ключевые слова: органические удобрения, методы микробиологического анализа, отбор проб, подготовка проб, питательные среды, разведение, посев, учет микроорганизмов

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 15.06.2012. Подписано в печать 04.07.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,70. Тираж 121 экз. Зак. 603.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.